

Université de Montréal

# **Implication du système cannabinoïde dans un nouveau modèle de douleur neuropathique périphérique**

par

Jean-Sébastien Walczak

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Pharmacologie

Mars, 2006

© Jean-Sébastien Walczak, 2006



W

4

U58

2006

V.092

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Implication du système cannabinoïde dans un nouveau modèle de douleur neuropathique  
périphérique

présentée par :

Jean-Sébastien Walczak

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Louis-Éric Trudeau, président-rapporteur

Dr Pierre Beaulieu, directeur de recherche

Dr Réjean Couture, membre du jury

Dr Alfredo Ribeiro-da-Silva, examinateur externe

Dr Pierre Rainville, représentant du doyen de la FES



## Résumé

La douleur neuropathique est difficilement traitable cliniquement et demeure un des problèmes les plus importants concernant le traitement de la douleur. Il reste en effet beaucoup de points à éclaircir quant à l'étiologie et la pathophysiologie de la douleur neuropathique. Étant donné la variabilité des causes et des mécanismes impliqués dans la douleur neuropathique, une variété de modèles animaux permet d'étudier certains aspects spécifiques de ce phénomène. Afin de soulager la douleur neuropathique le système cannabinoïde attire l'intérêt des chercheurs depuis quelques années. Les récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> entraînent des réponses cellulaires modulant l'activité neuronale et immunitaire. Leur activation permet une inhibition du message douloureux car ils sont exprimés à différents endroits du système nociceptif. Cependant, on connaît peu de choses quant à l'expression des récepteurs cannabinoïdes en condition de douleur neuropathique, particulièrement au niveau du système nerveux périphérique.

Afin d'augmenter la variété de modèles de douleur neuropathique pour mieux comprendre la pathophysiologie de la douleur neuropathique, nous avons développé un modèle ciblant le nerf saphène par lésion mécanique chez le rat et la souris. Le nerf saphène a la propriété d'être composé de fibres exclusivement sensibles, ce qui permet notamment d'éviter les problèmes moteurs suite à la lésion. Après avoir caractérisé ces modèles chez le rat et la souris, nous avons étudié l'expression des récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> à divers endroits de la voie afférente primaire du système nociceptif.

Nous avons démontré qu'une lésion du nerf saphène chez le rat et la souris entraîne de l'allodynie et de l'hyperalgésie. Ces symptômes de douleur neuropathique sont sensibles à des traitements par des composés de différentes classes pharmacologiques utilisés contre la douleur neuropathique : morphine, gabapentine, amitriptyline ainsi qu'un cannabinoïde, le WIN 55, 212-2. La lésion du nerf saphène entraîne également des réarrangements moléculaires et électrophysiologiques. Enfin, nous avons montré que l'expression des

récepteurs cannabinoïdes était augmentée au niveau des segments la moelle épinière, des ganglions rachidiens et du territoire cutané, concernés par le nerf saphène.

Le modèle de douleur neuropathique sur le nerf saphène permettra de mieux comprendre la physiopathologie de la douleur neuropathique périphérique notamment à l'aide de la technique électrophysiologique nerf-saphène peau. L'augmentation de l'expression des récepteurs cannabinoïdes en périphérie révèle un potentiel analgésique des cannabinoïdes, dépourvu des effets psychotropes délétères, contre la douleur neuropathique.

**Mots-clés :** douleur neuropathique, allodynie, hyperalgésie, modèles animaux, récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>, récepteurs opioïdes, électrophysiologie, mécanismes périphériques.

## Abstract

Neuropathic pain is one of the most inextricable problems encountered in clinics. Indeed, few facts are known about its etiology and pathophysiology. Since neuropathic pain has many causes and mechanisms, there is a need for various types of neuropathic pain models in order to study specific aspects implicated in neuropathic pain. In order to find a treatment against neuropathic pain, interest has been recently focused on the cannabinoid system. Indeed, cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor activation modulates neuronal and immune activity. These receptors are expressed at different locations of the nociceptive pathway, and can inhibit noxious information. However, little is known about the expression of cannabinoid receptors in neuropathic pain conditions, especially in the peripheral nervous system.

In order to increase the number of neuropathic pain models, we have developed in rats and mice a new model focussing on the saphenous nerve and consisting of mechanical injury to the nerve. The saphenous nerve is an exclusively sensory nerve, whose lesion is not associated with motor impairments. After characterization of the saphenous model of neuropathic pain in rats and mice, we studied the expression of the cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors at different levels of the nociceptive primary afferent pathway.

We showed in rats and mice that a peripheral injury to the saphenous nerve induced allodynia and hyperalgesia. These symptoms of neuropathic pain were sensitive to standard pharmacological treatments used against neuropathic pain: morphine, gabapentine, amitriptyline and the cannabinoid agonist, WIN 55, 212-2. Also, injury to the saphenous nerve led to molecular and electrophysiological rearrangements. Finally, we showed that the expression of cannabinoid receptors was increased in the spinal cord, dorsal root ganglia, and the skin territory of the saphenous nerve.

Neuropathic pain models on the saphenous nerve will help to better understand the pathophysiology of neuropathic pain induced by a peripheral lesion especially when used in

combination with the skin-nerve preparation electrophysiological technique. The peripheral increase in the expression of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors highlights the relevance of using peripheral approaches to treat neuropathic pain with cannabinoids. Indeed, it would produce analgesia without unwanted central psychoactive effects.

**Keywords :** neuropathic pain, allodynia, hyperalgesia, animal models, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors, opioid receptors, electrophysiology, peripheral mechanisms.

## Table des matières

Introduction – recensement de la littérature.....	1
1. Importance du système cannabinoïde .....	1
1.1. Historique.....	1
1.2. Cannabinoïdes présents dans la plante.....	2
1.3. Système cannabinoïde.....	2
1.3.1. Récepteurs cannabinoïdes .....	2
1.3.2. Ligands endogènes .....	3
1.3.3. Autres récepteurs cannabinoïdes ? .....	4
1.4. Synthèse et métabolisme des endocannabinoïdes .....	4
1.5. Effets cellulaires de l'activation des récepteurs cannabinoïdes .....	6
1.5.1. Modulation de l'adénylate cyclase.....	6
1.5.2. Modulation des canaux ioniques.....	6
1.5.3. Régulation des voies de destinée cellulaire.....	7
1.6. Système cannabinoïde et douleur.....	9
1.6.1. Les voies de la douleur.....	9
1.6.2. Localisation du système cannabinoïde dans le système nociceptif.....	12
1.6.2.1. Récepteur CB <sub>1</sub> .....	12
1.6.2.2. Récepteur CB <sub>2</sub> .....	15
1.6.3. Effets analgésiques des cannabinoïdes.....	17
1.6.3.1. Cannabinoïdes et douleur aiguë .....	17
1.6.3.2. Cannabinoïdes et douleur inflammatoire .....	19
1.6.3.3. Cannabinoïdes et douleur neuropathique.....	20
1.7. Cannabinoïdes : conclusion .....	21
2. Douleur neuropathique.....	22
2.1. Définition .....	22
2.2. Mécanismes de la douleur neuropathique .....	24
2.2.1. Mécanismes au niveau central .....	24

2.2.1.1. Niveau cérébral .....	24
2.2.1.2. Niveau spinal.....	25
2.2.1.2.1. Réorganisation anatomique .....	25
2.2.1.2.2. Hyperexcitabilité .....	26
2.2.2. Mécanismes périphériques .....	30
2.2.2.1. Décharges ectopiques.....	30
2.2.2.2. Conduction éphaptique.....	31
2.2.2.3. Rôle du système immunitaire.....	32
2.2.2.4. Repousse axonale .....	33
2.2.2.5. Association entre le système sympathique et le système nerveux sensoriel .....	33
2.2.2.6. Sensibilisation des nocicepteurs.....	34
2.3. Systèmes opioïdes et cannabinoïdes .....	36
2.3.1. Récepteurs opioïdes .....	36
2.3.2. Récepteurs cannabinoïdes .....	38
2.4. Traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique.....	39
2.4.1. Amitriptyline .....	39
2.4.2. Gabapentine.....	40
2.4.3. Opioïdes .....	40
2.4.4. Cannabinoïdes .....	42
2.5. Modèles animaux de douleur neuropathique .....	42
2.5.1. Modèles de douleur neuropathique ciblant le nerf sciatique.....	43
2.5.2. Autres modèles de douleur neuropathique périphérique.....	46
2.5.3. Animaux utilisés .....	46
2.5.4. Mesures de la douleur neuropathique chez les animaux .....	47
2.5.4.1. Mesures de l'hypersensibilité mécanique .....	47
2.5.4.2. Mesures de l'hypersensibilité à la chaleur et au froid.....	48
2.5.5. Nerf saphène.....	49

3. Hypothèses de recherche.....	51
Articles .....	53
Article n°1 Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain.....	54
Article n° 2 Characterization of the chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes.....	83
Article n° 3 Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique.....	118
Discussion .....	138
4. Études comportementales.....	138
4.1. Comparaison rats – souris.....	138
4.2. Comparaison avec le nerf sciatique.....	140
4.3. Cas de la mesure de l'allodynie au froid chez la souris .....	142
5. Études pharmacologiques.....	144
5.1. Morphine.....	145
5.1.1. Comparaison rat – souris.....	145
5.1.2. Comparaison avec le nerf sciatique.....	145
5.2. Gabapentine.....	146
5.2.1. Comparaison rat – souris.....	146
5.2.2. Comparaison avec le nerf sciatique.....	147
5.3. Amitriptyline.....	148
5.3.1. Comparaison rat – souris.....	148
5.3.2. Comparaison avec le nerf sciatique.....	149
5.4. Cannabinoïde WIN 55, 212-2 .....	151
5.4.1. Comparaison rat – souris.....	151
5.4.2. Comparaison avec le nerf sciatique.....	152
5.5. Résumé des études pharmacologiques .....	152
6. Implication des systèmes opioïde et cannabinoïde .....	153

6.1. Expression des récepteurs .....	153
6.2. Récepteur MOR .....	154
6.3. Récepteurs cannabinoïdes .....	156
7. Réarrangements électrophysiologiques.....	158
7.1. Cartographie de l'innervation fonctionnelle .....	159
7.2. Décharges ectopiques.....	159
Conclusion - Perspectives .....	163
Bibliographie.....	166



## Liste des sigles et des abréviations

- 2-AG : 2-arachidonyl-glycérol  
5-HT : sérotonine  
ACV : accident cérébrovasculaire  
AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ASIC : *acid sensitive ionic channel*  
ATP : adénosine tri-phosphate  
B1 et B2 : récepteurs de la bradykinine 1 et 2  
BDNF : *Brain Derived neurotrophic factor*  
CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> : récepteurs cannabinoïdes 1 et 2  
CCI : *Chronic constriction injury*  
CCK : cholécystokinine  
CCS : *Chronic constriction of the saphenous nerve*  
CGRP : *Calcitonin Gene Related Peptide*  
CRPS : *Complex Regional Pain Syndrome*  
DAGL : diacylglycérol lipase  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DOR ou DOP : récepteur  $\delta$  opioïde  
DRG : ganglion rachidien  
EMT : transporteur membranaire des endocannabinoïdes  
ERK : *Extracellular signal Regulated Kinases*  
FAAH : *Fatty Acid Amido Hydrolase*  
FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorter*  
GABA : acide gamma amino butyrique  
GAPDH : *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*  
GAT-1 : transporteur de GABA

GDNF : *Gial cells Derived Neurotrophic Factor*  
GIRK : canal potassique rectifiant activé par les protéines G  
HSV-1 : Herpes simplex virus-1  
Hz : Hertz  
i.c.v. : intra-cérébroventriculaire  
i.p. : intra-péritonéale  
i.t. intra-thécale  
i.v. : intra-veineuse  
IB4 : isolectine B4  
IgG : immunoglobuline G  
IL-6 : interleukine-6  
JNK : *c-jun-N-terminal kinase*  
kDa : kilo Dalton  
KOR ou KOP : récepteur  $\kappa$  opioïde  
LC : locus coeruleus  
MAGL : monoacylglycérol lipase  
MAP Kinases : *Mitogen-Activated Protein Kinases*  
 $Mg^{2+}$  : ion magnésium  
MOR ou MOP : récepteur  $\mu$  opioïde  
NarPE : N arachidonyl phosphatidyléthanolamide  
 $Na_v$  : Canaux sodiques sensibles au voltage  
NGF : *Nerve Growth Factor*  
NK : *Natural Killer*  
NK1 : neurokinine 1  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
NO : monoxyde d'azote  
NOR ou NOP : récepteur opioïde répondant à la nociceptine  
NRM : noyau raphé magnus

NRPG : noyau paragigantocellulaire

ORL-1 : *opioid receptor-like 1*

p.o. : *per os*

P2X : récepteur à l'ATP

PAG : substance grise périaqueducule

PGE2 : prostaglandine E2

PGs : prostaglandines

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC (ou D) : phospholipase C ( ou D)

PMSF : *phenyl methyl sulfonyl fluoride*

PSL : *Partial sciatic nerve ligation*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

s.c. : sous-cutanée

SEP : sclérose en plaque

SNI : *Spared nerve injury*

SNL : *Spinal nerve ligation*

SPL : *Saphenous nerve partial ligation*

TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor- $\alpha$*

TrkA : Tyrosine kinase A

TRP : *Transient Receptor Potential*

TRPV1 : *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*

VIH : virus d'immunodéficience humaine

VR1 : *Vanilloid Receptor 1*

$\Delta^9$ -THC :  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol

## Liste des tableaux

**Tableau I** : Modèles animaux de douleur aiguë pour lesquels le  $\Delta^9$ -THC présente des effets analgésiques. (p. 18)

**Tableau II** : Exemples de pathologies pouvant causer une douleur neuropathique. (p. 23)

## Liste des figures

**Figure 1:** Synthèse et métabolisme de l'anandamide et du 2-arachidonyl glycérol (2-AG). (p. 5)

**Figure 2 :** Représentation schématique des principaux effets cellulaires de l'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. (p. 8)

**Figure 3 :** Principales voies ascendantes transmettant l'information nociceptive de la moelle épinière vers les centres supérieurs du système nerveux central. (p. 10)

**Figure 4 :** Schéma représentant le système nociceptif avec les voies descendantes inhibitrices. (p. 11)

**Figure 5 :** Schéma montrant la localisation des récepteurs CB<sub>1</sub> aux niveaux périphérique et de la moelle épinière. (p. 15)

**Figure 6 :** Événements spinaux survenant après une lésion nerveuse périphérique. (p. 29)

**Figure 7 :** Changements survenant au niveau axonal suite à une lésion nerveuse périphérique. (p. 32)

**Figure 8 :** Récepteurs, canaux et mécanismes de transduction des terminaisons des neurones afférents primaires. (p. 34)

**Figure 9 :** Schéma représentant les principaux modèles animaux de douleur neuropathique sur le nerf sciatique par lésion mécanique. (p. 45)

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Pierre Beaulieu, mon directeur de recherche, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son aide, ses conseils et son enthousiasme communicatif me furent précieux tout au long de mon doctorat. Je remercie également le Dr Beaulieu de m'avoir fait participer à de nombreux congrès ainsi qu'à divers travaux connexes à mon doctorat (chapitres de livre, cours) qui ont enrichi mon expérience. Enfin, je remercie le Dr Beaulieu de m'avoir transmis sa science du lancé d'objets de diverses formes et natures à travers une salle de type cafétéria.

Je remercie également Pierre et toute sa famille (Michelle, Jean, Juju et Kanuk) de m'avoir accueilli lors de mon arrivée à Montréal. Sans leur aide ni leur accueil chaleureux, l'évocation de mon arrivée ici n'éveillerait certainement pas des souvenirs aussi agréables.

Je tiens à remercier Francine Legault pour m'avoir aidé à prendre mes repères au début de mon doctorat. Son expérience me fut très utile. Je remercie Josée Guindon pour sa bonne humeur qui a permis de rendre le laboratoire nettement moins silencieux. Je remercie également tous les membres du laboratoire du Dr Vincent Pichette pour leur collaboration importante dans mes travaux de recherche.

Je remercie également tous les membres du département de pharmacologie pour leur accueil. Plus spécifiquement : Sylvie et Francine sans qui nous ne serions rien ; la Dre Chantal Lambert pour son accueil et ses conseils ; le Dr Patrick Du Souich pour m'avoir maintenu éveillé tout au long de mon doctorat, tout autant que les bonjours matinaux de Lucie dans le couloir. Je remercie spécialement Élodie et les filles du laboratoire du Dr Gauchat (surtout Angélique ☺, surtout Isa et surtout Alexandra) pour avoir passé autant de bons moments ensemble.

Un merci particulier à Nono et Mama qui sont également de véritables amis.

Enfin, je tiens à remercier ma famille qui m'a soutenu et encouragé dans mon projet d'étudier à l'étranger malgré la distance et la rareté de mes visites. Pour la peine, ils ont droit à une page pour eux seuls.

# Introduction – recensement de la littérature

## 1. Importance du système cannabinoïde

### 1.1. Historique

Le chanvre, ou *Cannabis sativa*, est utilisé pour ses propriétés récréatives mais également thérapeutiques depuis plusieurs milliers d'années. Il y a environ 5 000 ans, la première trace d'utilisation du cannabis est décrite dans la pharmacopée chinoise Pen Ts'ao. L'empereur Shen Nung, recommandait le cannabis comme traitement adjuvant dans différentes affections : paludisme, constipation, douleurs rhumatismales et comme sédatif. De Chine, l'usage du cannabis s'est répandu vers l'Inde et les pays voisins. Au début du XVIIIe siècle, le cannabis est utilisé contre les constipations, les différentes maladies inflammatoires, également comme traitement de la dépression. Au milieu du XIXe siècle, W. B. O'Shaughnessy, professeur à la faculté de médecine de Calcutta, publia un traité concernant l'usage médical du cannabis. Après des expérimentations animales, il utilisa le cannabis dans le traitement de la rage, des rhumatismes, de l'épilepsie et du tétanos. Dès son retour en Europe, il continua la prescription du cannabis. Le médecin personnel de la reine Victoria d'Angleterre lui prescrivait du cannabis comme analgésique. Plusieurs effets thérapeutiques du cannabis ont ainsi été rapportés. C'est au début du XIXe siècle qu'a commencé la recherche des composés actifs de la plante. À l'instar du pavot, durant près d'un siècle les recherches s'étaient d'abord concentrées vainement sur les alcaloïdes ce qui a retardé l'isolement des composés actifs de la plante. A la fin du XIXe siècle, un composé de 21 atomes de carbone ( $C_{21}H_{18}O_2$ ) fut isolé, mais sa structure chimique n'était pas connue. On lui a donné le nom de cannabinal, ce composé a été considéré à tort comme le principe actif du cannabis. Le cannabidiol, un composé non psychoactif fut découvert dans les années 1940 mais sa structure stéréochimique ne fut élucidée qu'en 1963 (Mechoulam et Hanus 2000). Finalement, c'est avec l'isolement en 1964 par Gaoni et Mechoulam du  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) le premier composé purifié montrant une action



psychoactive que la pharmacologie des cannabinoïdes a réellement débuté (Gaoni et Mechoulam 1964).

## 1.2. Cannabinoïdes présents dans la plante

Jusqu'à présent, dans la plante, 66 terpénophénols à 21 atomes de carbone dont la structure est apparentée au  $\Delta^9$ -THC ont été identifiés et caractérisés comme cannabinoïdes :  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC, cannabinal, cannabidiol, cannabigérol, cannabichromène, cannabicyclol, etc. La proportion de ces composés dans la plante dépend de la variété et des conditions de culture (humidité, température, nutriments, etc.) ou de stockage ainsi que l'âge et la partie de la plante (fleurs, feuilles, racine, tige, etc.) (Di Marzo et De Petrocellis 2006).

Concernant les alcaloïdes, dont la recherche fut active durant le XIXe siècle, le premier alcaloïde du cannabis à être identifié a été la cannabistatine en 1975. La très faible concentration de ce composé dans la plante n'explique pas les effets du cannabis (Mechoulam et Hanus 2000).

## 1.3. Système cannabinoïde

### 1.3.1. Récepteurs cannabinoïdes

Une trentaine d'années après la découverte de la principale substance du cannabis, les cibles biologiques du  $\Delta^9$ -THC ont été identifiées avec la caractérisation de récepteurs spécifiques. Il s'agit des récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> (Matsuda *et al.* 1990) et CB<sub>2</sub> (Munro *et al.* 1993). Le premier a été mis en évidence dans le système nerveux central au niveau de zones correspondant aux effets psychotropes des cannabinoïdes. De ce fait, le récepteur CB<sub>1</sub> est exprimé dans le globus pallidus, le putamen caudal latéral et la substance noire de même que dans le cervelet, correspondant aux effets moteurs des cannabinoïdes. La localisation dans le néocortex et l'hippocampe se rapproche des effets des cannabinoïdes sur les performances cognitives et la mémoire. En revanche, la densité de récepteurs CB<sub>1</sub>

est très faible dans le tronc cérébral, expliquant ainsi les faibles effets des cannabinoïdes, contrairement au système opioïde, sur les fonctions cardiovasculaires et respiratoires (Lutz 2002).

Quant au récepteur CB<sub>2</sub>, il a été isolé à partir d'organes du système immunitaire et est principalement retrouvé dans ceux-ci à la périphérie (amygdales, zone marginale de la rate et dans les cellules immunitaires : Lymphocytes B et T, monocytes, macrophages) (Lutz 2002). Le récepteur CB<sub>2</sub> est globalement considéré absent du système nerveux central, mais il a été récemment mis en évidence sur les neurones du cortex, du cervelet et du tronc cérébral. Dans ce dernier, le niveau d'expression du récepteur CB<sub>2</sub> correspond à moins de 2% de celui de la rate. Le récepteur CB<sub>2</sub> participerait ici à l'effet anti-émétique des cannabinoïdes (Van Sickle *et al.* 2005). Une étude récente a révélé la présence du récepteur CB<sub>2</sub> par immunohistochimie dans diverses zones du cerveau : dans les cellules de Purkinje du cervelet, dans les cellules pyramidales de l'hippocampe ainsi que dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, le striatum, le thalamus, la substance grise périaqueducule, etc (Gong *et al.* 2006). En outre, par l'intermédiaire des cellules microgliales, il est possible de retrouver le récepteur CB<sub>2</sub> dans le système nerveux central (Zhang *et al.* 2003).

### 1.3.2. Ligands endogènes

Concomitamment à l'identification des récepteurs, leurs ligands endogènes, ou endocannabinoïdes, ont été isolés. L'anandamide, dont le nom provient du terme sanskrit « *ananda* » signifiant félicité, a été isolé à partir de cerveaux porcins (Devane *et al.* 1992). Comme son nom chimique l'indique (N-arachidonoyléthanolamide), la structure de l'anandamide dérive de l'acide arachidonique. D'autres substances endogènes dérivant de cet acide gras ont également été décrites comme agonistes des récepteurs cannabinoïdes. Il s'agit du 2-arachidonoyl-glycérol (ou 2-AG) (Mechoulam *et al.* 1995; Sugiura *et al.* 1995) et du 2-arachidonoyl glycéryl éther (Hanus *et al.* 2001). Depuis, d'autres endocannabinoïdes ont été découverts (voir (Di Marzo et De Petrocellis 2005) pour une revue de la littérature),

les principaux restant l'anandamide et le 2-AG; ces deux substances peuvent activer les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> (McAllister et Glass 2002).

### 1.3.3. Autres récepteurs cannabinoïdes ?

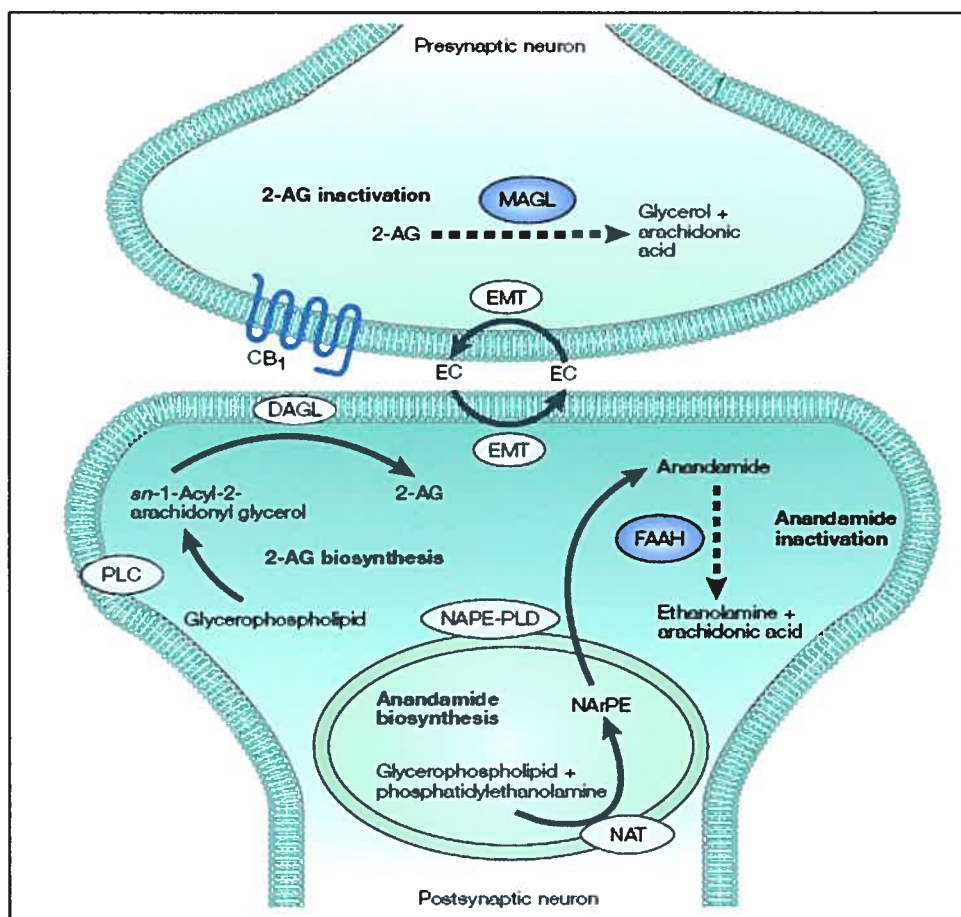
Plusieurs arguments tendent à démontrer l'existence d'autres récepteurs cannabinoïdes. Tout d'abord il y a le fait que les ligands endogènes peuvent se lier à d'autres récepteurs. Par exemple, l'anandamide est à hautes doses un agoniste du récepteur vanilloïde TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), anciennement appelé VR1, sensible à la chaleur, aux protons ainsi qu'à la capsaïcine (agent piquant retrouvé dans les piments forts) (Zygmunt *et al.* 1999). En outre des cannabinoïdes provoquent des effets centraux, théoriquement non induits par le récepteur CB<sub>2</sub>, chez des animaux dont le gène encodant le récepteur CB<sub>1</sub> a été invalidé ou traités par un antagoniste sélectif du récepteur CB<sub>1</sub>, supportant ainsi l'hypothèse d'un troisième récepteur cannabinoïde (CB<sub>3</sub> ?) (Adams *et al.* 1998; Fride *et al.* 2003; Baskfield *et al.* 2004).

## 1.4. Synthèse et métabolisme des endocannabinoïdes

L'anandamide est formé à partir de phospholipides membranaires ou d'acide arachidonique libre. Une transacylase dépendante de la concentration calcique formera un intermédiaire (N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine) qui sera pris en charge par une phosphodiesterase pour former l'anandamide (N-arachidonoyléthanolamide).

Dans le système nerveux central, les endocannabinoïdes, et cela a été principalement démontré avec l'anandamide, agissent de façon rétrograde au niveau synaptique pour inhiber la libération de neurotransmetteurs. Ainsi, suite à une stimulation de la cellule post-synaptique, l'anandamide est synthétisée sur demande et est libérée dans l'espace synaptique par diffusion à travers la membrane. Ensuite, l'anandamide peut agir sur les récepteurs cannabinoïdes présents surtout au niveau présynaptique pour réduire la quantité de neurotransmetteurs libérés. Cette action est diminuée rapidement par la

*recapture* des endocannabinoïdes via une protéine non encore identifiée mais sensible à un bloquant spécifique au niveau post-synaptique. A cet endroit l'anandamide est rapidement dégradée par la FAAH (*Fatty Acid Amido Hydrolase*) pour donner de l'acide arachidonique et de l'éthanolamine (Sugiura *et al.* 2002; Di Marzo *et al.* 2004) (voir **Figure 1**).



**Figure 1:** Synthèse et métabolisme de l'anandamide et du 2-arachidonyl glycérol (2-AG).

DAGL : diacylglycérol lipase, EC : endocannabinoïdes, EMT : transporteur membranaire des endocannabinoïdes, PLC (ou D) : phospholipase C (ou D), NarPE : N arachidonyl phosphatidyléthanolamide, FAAH : *fatty acid amido hydrolase*, MAGL : monoacylglycérol lipase. Reproduit d'après (Di Marzo *et al.* 2004).

## 1.5. Effets cellulaires de l'activation des récepteurs cannabinoïdes

### 1.5.1. Modulation de l'adénylate cyclase

Les récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils se couplent à la protéine Gi/o inhibant ainsi l'accumulation d'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) dans la cellule due à l'adénylate cyclase (Felder *et al.* 1995; Shoemaker *et al.* 2005). Cependant, sous certaines conditions, le récepteur CB<sub>1</sub> semble susceptible de stimuler l'adénylate cyclase en se couplant à la protéine Gs (Glass et Felder 1997; Bonhaus *et al.* 1998). Le résultat de la diminution d'AMPc est une diminution de l'activité de la protéine kinase A (PKA) pouvant induire notamment une diminution de production de monoxyde d'azote (Waksman *et al.* 1999; Kim *et al.* 2006). Cette diminution de la cascade de signalisation de l'AMPc pourrait expliquer les effets immunomodulateurs des cannabinoïdes (Kaminski 1998).

### 1.5.2. Modulation des canaux ioniques

L'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> sur les terminaisons présynaptiques entraîne une inhibition directe des canaux calciques sensibles au voltage de type L, N et P/Q par la protéine G (Venance *et al.* 2004). La conséquence de l'inhibition du canal de type N est une diminution de la libération de neurotransmetteurs. Cela a été démontré pour les terminaisons présynaptiques contenant de l'acétylcholine, du GABA (acide gamma amino butyrique), du glutamate et de la noradrénaline (Gifford et Ashby 1996; Shen *et al.* 1996; Kathmann *et al.* 1999; Katona *et al.* 1999). Certaines études ont montré une inhibition de la libération de dopamine par les cannabinoïdes par exemple sur la rétine (Schlicker *et al.* 1996) ou le striatum (Cadogan *et al.* 1997). Cette dernière étude est cependant en contradiction avec des études plus récentes démontrant que les cannabinoïdes ne modifient pas la libération de dopamine directement au niveau synaptique (Szabo *et al.* 1999; Kofalvi *et al.* 2005).

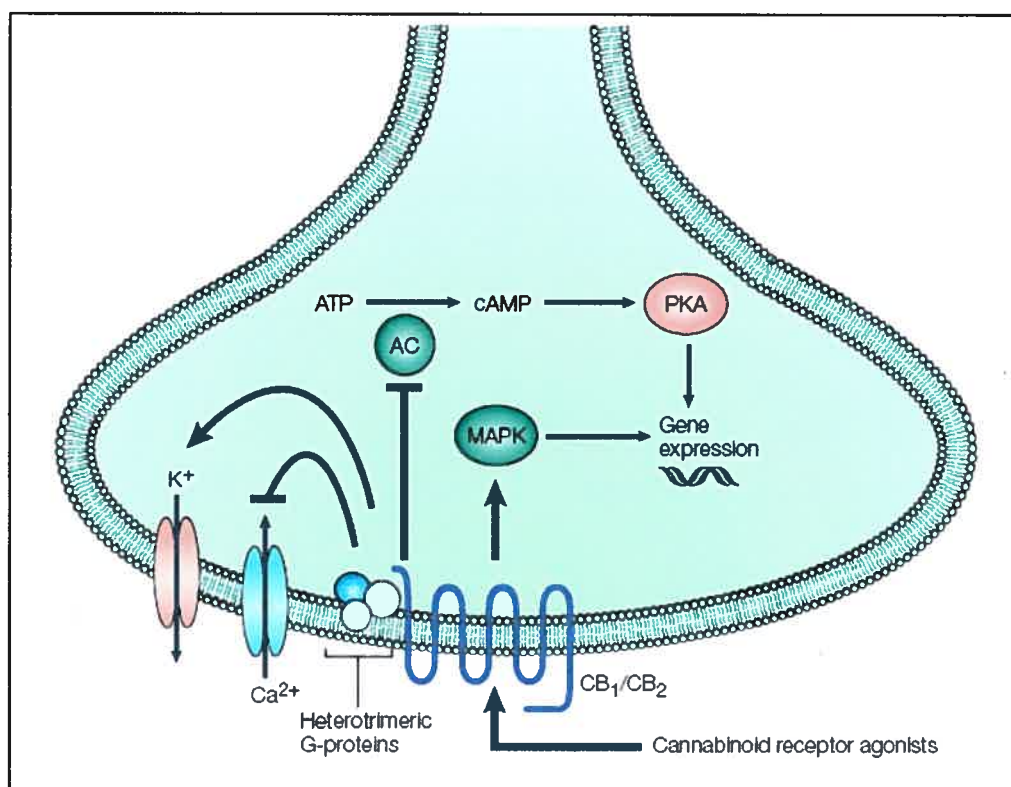
Les courants provenant des canaux sodiques sensibles au voltage peuvent également être réduits par les cannabinoïdes. Cela a été montré en culture avec du  $\Delta^9$ -THC (Turkanis *et al.* 1991), dans le cerveau avec un agoniste CB<sub>1</sub> (Liao *et al.* 2004) et dans les neurones des ganglions rachidiens avec l'anandamide (Kim *et al.* 2005). Cependant, dans cette dernière étude, il semble que l'anandamide agisse directement sur le canal sodique puisqu'aucun antagoniste des récepteurs CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> ou TRPV1 n'agit sur la modulation de l'anandamide.

Concernant les canaux potassiques, l'anandamide via le récepteur CB<sub>1</sub> est capable d'augmenter le courant potassique rectifiant activé par les protéines G (GIRK) (McAllister *et al.* 1999; Guo et Ikeda 2004). Les courants potassiques de type A semblent être activés par les récepteurs cannabinoïdes (Deadwyler *et al.* 1995) mais il apparaît que cette activation se fait partiellement par l'intermédiaire de la PKA (Hampson *et al.* 1995). Enfin les canaux potassiques sensibles au calcium à grande conductance sont ouverts par les cannabinoïdes, mais il ne semble pas que cette action passe par l'intermédiaire des récepteurs CB<sub>1</sub> (O'Sullivan *et al.* 2005; Sade *et al.* 2006). Cependant, une étude a montré une implication des récepteurs CB<sub>1</sub> dans l'ouverture de ces canaux potassiques (Stumpff *et al.* 2005). Une autre étude sur les voies respiratoires a montré que le récepteur CB<sub>2</sub> pouvait en partie expliquer l'ouverture de ces canaux (Yoshihara *et al.* 2005).

### 1.5.3. Régulation des voies de destinée cellulaire

Par l'intermédiaire des protéines G, l'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> entraîne une augmentation de l'activité de ERK (*Extracellular signal Regulated Kinases*) qui fait partie de la grande famille des MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). Cette activation de ERK contrôlerait ainsi l'induction de différents facteurs de transcriptions (McAllister et Glass 2002; Derkinderen *et al.* 2003).

L'activation du récepteur CB<sub>1</sub> peut également aboutir à augmenter l'activité de *c-jun-N-terminal kinase* (JNK) (Rueda *et al.* 2000) ainsi que la voie des p38-MAP Kinases (Derkinderen *et al.* 2001). Il a été récemment démontré que cette voie était impliquée dans l'apoptose de cellules leucémiques induite par l'activation du récepteur CB<sub>2</sub> (Herrera *et al.* 2005) (voir **Figure 2**).



**Figure 2 :** Représentation schématique des principaux effets cellulaires de l'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. La protéine Gi/o va activer les canaux potassiques et inhiber les canaux calciques. La diminution de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et l'activation de la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) va entraîner une modification de l'expression génique. Le mécanisme impliqué dépend du type cellulaire. Reproduit d'après (Di Marzo *et al.* 2004).

## 1.6. Système cannabinoïde et douleur

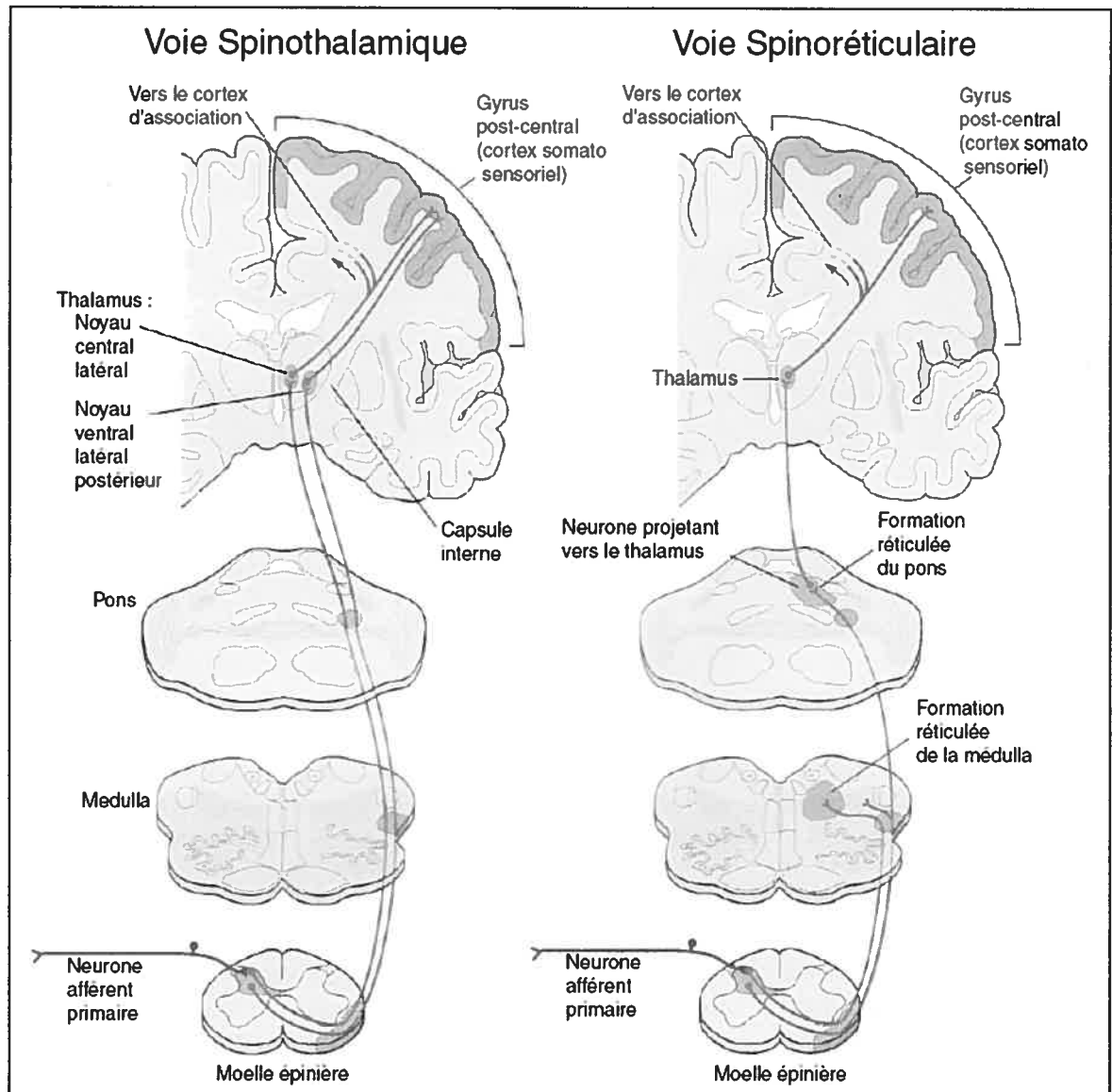
Les cannabinoïdes, qu'ils soient naturels ou synthétiques, agissent sur la plupart des systèmes biologiques. Ainsi, en plus des effets hallucinogènes connus, les cannabinoïdes ont entre autres des actions anxiolytiques, sédatives, anti-émétiques et stimulant sur l'appétit (Ashton 2001). Nous allons nous concentrer sur les effets analgésiques des cannabinoïdes essentiellement par action au niveau spinal et périphérique puisque ce sont les effets les plus pertinents quant à l'application clinique des cannabinoïdes. En effet, les actions supra-spinales des cannabinoïdes entraînent des effets secondaires non recherchés.

### 1.6.1. Les voies de la douleur

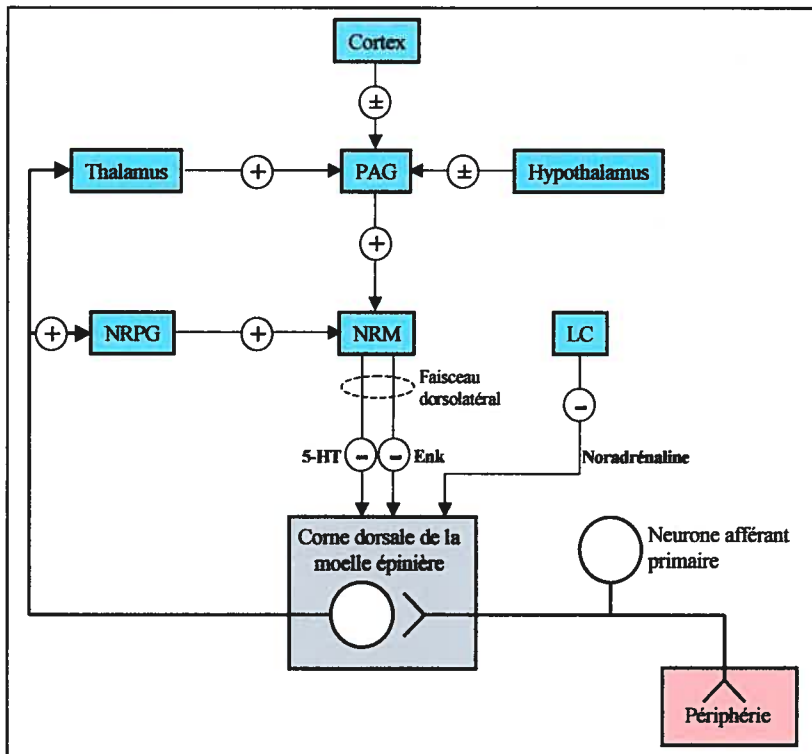
Le système nociceptif est la composante neurophysiologique de la douleur qui permet la perception des stimuli susceptibles de menacer l'intégrité de l'organisme ainsi que la transmission du message nociceptif vers le cerveau. C'est à ce niveau que la composante psychologique intervient pour « former » la douleur au sens propre du terme. Lors de la perception d'un stimulus délétère par les nocicepteurs (neurones afférents primaires en T ayant leur corps cellulaire dans les ganglions rachidiens avec des terminaisons à la périphérie d'une part et au niveau de la moelle épinière d'autre part), ceux-ci vont transmettre l'influx nerveux via une première synapse à un neurone secondaire situé dans la corne dorsale ipsilatérale de la moelle épinière, principalement au niveau des couches I, II et V. À partir de là, le message nociceptif peut prendre principalement deux voies : la voie spinothalamique latérale ou la voie spinoréticulaire (ou spinothalamique médiane). Ensuite, globalement, les noyaux latéraux du thalamus vont relayer l'information nociceptive vers les structures sensori-discriminative du cortex sensoriel alors que les noyaux médians vont faire relais vers les structures motivo-affectives du système limbique (voir **Figure 3**). Cette version linéaire des voies de la douleur peut être contrôlée au niveau spinal par des interneurons et des contrôles inhibiteurs descendants provenant de diverses



régions système nerveux central supérieur (noyau raphé magnus, substance grise périaqueducale, locus coeruleus) (Marchand 2005) (voir **Figure 4** p11).



**Figure 3 :** Principales voies ascendantes transmettant l'information nociceptive de la moelle épinière vers les centres supérieurs du système nerveux central. Modifié d'après Basbaum et Jessel (2000).



**Figure 4 :** Schéma représentant le système nociceptif avec les voies descendantes inhibitrices. PAG : substance grise périaqueducale; NRPG : noyau paragigantocellulaire; NRM : noyau raphé magnus; LC : locus coeruleus; 5-HT : sérotonine; Enk : enképhaline. Modifié d'après (Rang *et al.* 2003, b).

Parmi les fibres nerveuses afférentes primaires, on en distingue plusieurs types caractérisés par leurs propriétés électrophysiologiques. Les fibres A $\alpha$  sont les plus larges et les plus rapides avec une vitesse de conduction de 60 à 120 m.s<sup>-1</sup>. Elles sont responsables de la proprioception au niveau des muscles squelettiques. Les fibres A $\beta$ , larges et myélinisées ont une vitesse de conduction rapide (35-75 m.s<sup>-1</sup>). Ces fibres sont responsables de la perception non nociceptives comme le toucher léger. Les fibres A $\delta$ , d'un diamètre moins important et faiblement myélinisées, elles ont une vitesse de conduction également moins importante (5-30 m.s<sup>-1</sup>). Ces fibres sont responsables de la nociception mécanique et de la perception de la température (Marchand 2005). On distingue deux types de fibres A $\delta$  selon leur seuil d'activation thermique : les fibres de type I qui sont activées à des températures supérieures à 53°C et les fibres de type II activées à des températures supérieures à 43°C (Julius et Basbaum 2001). La plupart des fibres de type I sont sensibles aux stimuli mécaniques alors que la plupart des fibres de type II ne le sont pas (Meyer *et al.* 2006). Enfin, il existe les fibres C, qui sont amyéliniques et de plus petit diamètre. Leur

vitesse de conduction est de 0.5 à 2 m.s<sup>-1</sup>. Ces fibres sont de nature polymodale puisqu'elles participent à la nociception qu'elle soit d'origine mécanique thermique ou chimique (Marchand 2005). Parmi les fibres C, on distingue les fibres peptidergiques, qui synthétisent des peptides comme la substance P, le CGRP (*Calcitonin Gene Related Peptide*) et sont sensibles au NGF (*Nerve Growth Factor*) par l'intermédiaire d'un récepteur dénommé TrkA (Tyrosine kinase A). Les fibres C non peptidergiques expriment l'isolectine B4 (IB4) ainsi que le récepteur P2X3 de l'ATP (Adénosine triphosphate), et sont sensibles au GDNF (*Gial cells Derived Neurotrophic Factor*). Chez la souris, la majorité des fibres peptidergiques (exprimant le CGRP) expriment le récepteur TRPV1 alors qu'il ne s'agit que d'une minorité pour les des fibres non peptidergiques exprimant l'IB4. Cependant, chez le rat, on retrouve TRPV1 exprimé dans la moitié de chaque population (peptidergique ou non). On ignore encore si ces différences entre fibres C correspondent à des nocicepteurs ayant des fonctions distinctes (Meyer *et al.* 2006).

### 1.6.2. Localisation du système cannabinoïde dans le système nociceptif

#### 1.6.2.1. Récepteur CB<sub>1</sub>

Les récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> se trouvent dans des régions impliquées dans la transmission ou la modulation de l'influx nociceptif (voir **Figures 3 et 4**). Ainsi, le récepteur CB<sub>1</sub> est exprimé dans les ganglions rachidiens en partie sur les neurones de petit diamètre (fibres C et A $\delta$ ). En culture, 98% des cellules exprimant le récepteur TRPV1 (dont l'expression est élevée dans les nocicepteurs) co-expriment le récepteur CB<sub>1</sub> (Ahluwalia *et al.* 2000). Une autre étude de la même équipe a montré que, parmi les cellules marquées pour le récepteur CB<sub>1</sub>, 32% coexpriment le CGRP et 48% co-expriment IB4 (Ahluwalia *et al.* 2002). Ces pourcentages de colocalisation obtenus en culture sont toutefois nettement plus élevés que ceux obtenus en utilisant d'autres techniques. En effet, par des techniques d'hybridation *in situ*, il a été montré que l'acide ribonucléique messager (ARNm) du récepteur CB<sub>1</sub> est seulement présent dans respectivement 13%, 10 % et 0,5% des cellules

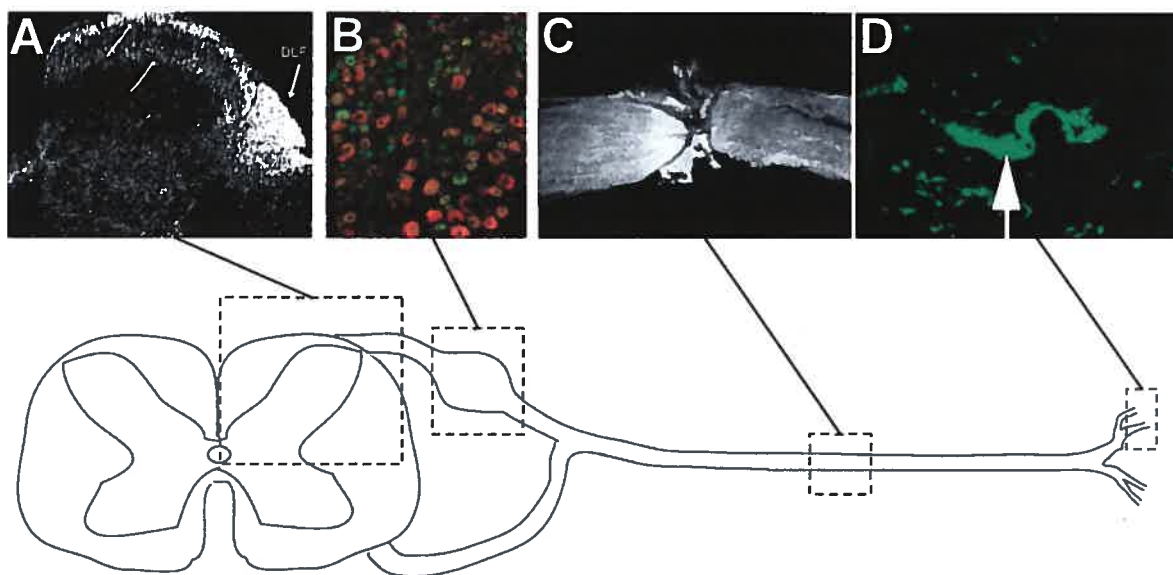
positives pour les ARNm de la substance P, du CGRP et de la somatostatine (Hohmann et Herkenham 1999, b). Bien que les récepteurs CB<sub>1</sub> soient exprimés dans un large éventail de neurones afférents primaires, il a été montré par des études d'immunohistochimie que l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> est plus importante dans les neurones de large diamètre, myélinisés (Bridges *et al.* 2003). Le récepteur CB<sub>1</sub> est retrouvé dans les fibres nerveuses ainsi et les racines dorsales (Sanudo-Pena *et al.* 1999; Stander *et al.* 2005). Confirmant le transport du récepteur CB<sub>1</sub> du ganglion rachidien vers la moelle épinière, plusieurs études ont montré que l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> dans la corne dorsale de la moelle épinière provenait en partie d'une localisation présynaptique des neurones afférents primaires (Hohmann *et al.* 1999, a; Morisset et Urban 2001; Salio *et al.* 2002, b). Il a également été démontré qu'une fois synthétisés dans les ganglions rachidiens, les récepteurs CB<sub>1</sub> sont transportés à la périphérie (Hohmann et Herkenham 1999, a). Toutefois, ces études sur le nerf sciatique, mixte (sensitif et moteur), ne permettent pas d'affirmer que les récepteurs CB<sub>1</sub> présents dans le nerf proviennent uniquement des corps cellulaires des ganglions rachidiens puisqu'on retrouve le récepteur CB<sub>1</sub> dans la corne ventrale de la moelle épinière ainsi qu'à la racine ventrale (Sanudo-Pena *et al.* 1999).

Dans la moelle épinière, on retrouve également l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> au niveau des couches superficielles des cornes dorsales et du faisceau dorsolatéral. La grande majorité des récepteurs CB<sub>1</sub> retrouvés dans la corne dorsale se trouve sur des neurones intrinsèques de la moelle épinière. En effet, à cet endroit, une rhizotomie dorsale entraîne une diminution faible (mais significative) de l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> (Sanudo-Pena *et al.* 1999; Farquhar-Smith *et al.* 2000). Quant au faisceau dorsolatéral, il serait le support de voies descendantes. Cependant, une hémisection de la moelle épinière ne modifie que très peu l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> dans le faisceau dorsolatéral. Il est donc fort probable que l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> soit localisée sur les interneurones situés dans le faisceau dorsolatéral (Farquhar-Smith *et al.* 2000). Une autre étude par immunohistochimie a montré la présence du récepteur CB<sub>1</sub> au niveau post-synaptique par

rapport aux neurones afférents primaires mais également sur les astrocytes des couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière (Salio *et al.* 2002, a).

Dans les structures supérieures du système nerveux central en relation avec une modulation du message nociceptif, les récepteurs CB<sub>1</sub> sont retrouvés dans la substance grise périaqueducale (Tsou *et al.* 1998). A cet endroit, ils joueraient notamment un rôle dans l'analgésie induite par le stress (Hohmann *et al.* 2005). Les récepteurs CB<sub>1</sub> augmentent également l'activité du locus coeruleus produite par les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), le récepteur CB<sub>1</sub> agirait en levant l'inhibition présynaptique GABAergique ou en modulant les voies intra-cellulaires post-synaptiques (Mendiguren et Pineda 2004). Enfin, il a été montré par des études d'immunohistochimie que le récepteur CB<sub>1</sub> se retrouvait dans le thalamus et le cortex (Pettit *et al.* 1998; Moldrich et Wenger 2000).

Il est à noter que, même si les niveaux d'expression sont moins importants que pour le récepteur CB<sub>2</sub>, on retrouve également le récepteur CB<sub>1</sub> exprimé dans les cellules immunitaires (Galiegue *et al.* 1995; Galiègue *et al.* 1995). De même, une étude a montré par analyse de type Northern que l'ARNm du récepteur CB<sub>1</sub> était présent dans les splénocytes (Schatz *et al.* 1997). Enfin, l'ARNm et la protéine du récepteur CB<sub>1</sub> sont présents dans les mastocytes et les macrophages (Samson *et al.* 2003; Stander *et al.* 2005).



**Figure 5 :** Schéma montrant la localisation des récepteurs CB<sub>1</sub> en périphérie et dans la moelle épinière. (A) Expression du récepteur CB<sub>1</sub> dans la corne dorsale de la moelle épinière observée par immunohistochimie, DLF = *Dorsolateral funiculus* (Farquhar-Smith *et al.* 2000); (B) Expression du récepteur CB<sub>1</sub> (rouge) dans les ganglions rachidiens, observée par immunohistochimie (Bridges *et al.* 2003); (C) Ligature du nerf sciatique révélant le transport axonal antérograde du récepteur CB<sub>1</sub> observé par autoradiographie (Hohmann et Herkenham 1999, a); (D) Expression du récepteur CB<sub>1</sub> au niveau des fibres nerveuses cutanées observée par immunohistochimie (Stander *et al.* 2005).

#### 1.6.2.2. Récepteur CB<sub>2</sub>

Tel que mentionné précédemment, le récepteur CB<sub>2</sub> est difficilement détectable dans le système nerveux alors que son expression est enrichie dans les cellules immunitaires. L'ARNm du récepteur CB<sub>2</sub> a été observé dans les cellules immunitaires à un niveau 10 à 100 fois plus élevé que le récepteur CB<sub>1</sub> selon le type de cellule immunitaire : lymphocytes B > cellules tueuses (NK) >> monocytes > polymorphonucléaires neutrophiles > lymphocytes T8 > lymphocyte T4 (Galiègue *et al.* 1995). Ainsi, la présence et le rôle du récepteur CB<sub>2</sub> s'expliqueraient dans le processus nociceptif par le phénomène inflammatoire qui accompagne toute lésion qu'elle soit d'ordre physique, thermique ou

encore chimique. Cependant, il est également possible d'observer le récepteur CB<sub>2</sub> dans le système nerveux. En effet, une première étude réalisée par FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) a montré que les cellules des ganglions rachidiens mises en culture expriment le récepteur CB<sub>2</sub> (Ross *et al.* 2001). En outre, une étude récente a non seulement révélé la présence du récepteur CB<sub>2</sub> dans les mastocytes, macrophages et kératinocytes de la peau, mais aussi sur les fibres nerveuses cutanées (Stander *et al.* 2005). Une autre étude, suite à une lésion du nerf sciatique, a montré l'accumulation du récepteur CB<sub>2</sub> sur la portion proximale des fibres nerveuses, ce qui laisse supposer un transport axonal du récepteur CB<sub>2</sub>. La présence neuronale du récepteur CB<sub>2</sub> est corroborée par le fait que les neurones des ganglions rachidiens mis en culture après axotomie expriment le récepteur CB<sub>2</sub> (Wotherspoon *et al.* 2005). Cette même étude a également montré que le récepteur CB<sub>2</sub> est exprimé, suite à une axotomie, dans la corne dorsale de la moelle épinière. Cette expression du récepteur CB<sub>2</sub> proviendrait des fibres afférentes primaires. Le récepteur CB<sub>2</sub> peut également être retrouvé dans la moelle épinière sur des cellules microgliales qui sont activées après une lésion nerveuse périphérique (Zhang *et al.* 2003). En outre, dans un modèle inflammatoire d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale, il a été montré par RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) que les cellules microgliales ont une synthèse d'ARNm du récepteur CB<sub>2</sub> multipliée par 10 (Maresz *et al.* 2005).

En résumé, les cannabinoïdes sont susceptibles de produire une analgésie soit par une action directe dans le cerveau en stimulant les voies descendantes inhibitrices (par levée d'inhibition) ou par une action directe dans la moelle épinière et les fibres nerveuses périphériques. Différentes études ont montré que les cannabinoïdes peuvent agir à ces trois niveaux. En effet, l'action analgésique des cannabinoïdes peut s'expliquer, en partie mais pas complètement, par une activation des voies descendantes inhibitrices (Gutierrez *et al.* 2003). Les cannabinoïdes administrés dans les ventricules cérébraux (Martin *et al.* 1993), par voie intrathécale (Hohmann *et al.* 1999, b; Hama et Urban 2004) ou de façon topique (Sawynok 2003; Yesilyurt *et al.* 2003) produisent un effet analgésique.

### 1.6.3. Effets analgésiques des cannabinoïdes

#### 1.6.3.1. Cannabinoïdes et douleur aiguë

De nombreuses études animales, notamment avec le  $\Delta^9$ -THC, ont démontré que les cannabinoïdes pouvaient être analgésiques face à la douleur aiguë. (voir **Tableau I** p.18)

Un agoniste spécifique du récepteur CB<sub>2</sub>, l'AM1241, a des propriétés antinociceptives suite à une stimulation thermique, que l'agoniste ait été administré localement ou par voie systémique (Malan *et al.* 2001). L'activation du récepteur CB<sub>2</sub> est également capable d'inhiber les réponses des neurones à large gamme dynamique dans la moelle épinière suite à des stimulations mécaniques (Elmes *et al.* 2004).



Stimulus nociceptif	Réponse	Espèce animale	Voies d'administration
Clamp sur la queue	Morsure du clamp etc.	Souris	p.o.
		Rat	s.c.
Clamp sur la queue	Concentration minimum alvéolaire (MAC) de cyclopropane pour empêcher une réponse motrice	Rat	i.p.
Clamp sur la queue	Concentration minimum alvéolaire (MAC) d'halothane pour empêcher une réponse motrice	Chien	i.v.
Thermique sur la queue	Retrait de la queue	Souris	i.v., i.p., s.c., p.o., i.t., i.c.v.
		Rat	i.v., i.p., i.t., i.c.v.
Plaque chauffante (patte)	Léchage de la patte, saut, fuite	Souris	i.v., i.p., s.c., p.o.
		Rat	i.v., i.p., s.c., i.c.v.
Thermique sur une aire du dos	Réflexe de secousse	Chien	i.v.
Pression sur les orteils	Réflexe de flexion	Chien	i.v.
Pression sur la patte arrière	Réponses motrices	Rat	i.p.
Électrique sur le pied	Réponses motrices	Rat	s.c.
Électrique sur le pied	Vocalisation	Rat	i.p.
Électrique sur le pied	Actionnement d'un levier	Singe	i.p.
Électrique sur le nerf sciatique	Vocalisation ou réponses motrices	Lapin	Non spécifié
Électrique sur la dent	Vocalisation ou réponses motrices	Chien	i.v.

**Tableau I :** Modèles animaux de douleur aiguë pour lesquels le  $\Delta^9$ -THC présente des effets analgésiques. (p.o. : *per os*, s.c. : sous-cutanée, i.p. : intra-péritonéale, i.v. : intra-veineuse, i.c.v. : intra-cérébroventriculaire, i.t. intra-thécale). D'après (Pertwee 2001).

### 1.6.3.2. Cannabinoïdes et douleur inflammatoire

Les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> sont susceptibles de réduire la douleur d'origine inflammatoire. Une étude récente a démontré que l'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> par des agonistes spécifiques diminuent à la fois la réponse nociceptive et l'œdème suite à l'injection de carragénine dans la patte (Conti *et al.* 2002; Elmes *et al.* 2005). Également, l'activation des deux types de récepteurs par un agoniste non sélectif, le WIN 55,212-2, inhibe l'augmentation de l'expression de c-Fos au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière induite par l'injection de carragénine. Cette diminution de l'expression de c-Fos peut-être inhibée par un antagoniste sélectif des récepteurs CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub> (Nackley *et al.* 2003). En outre, lors du test au formol, l'injection locale d'anandamide agit contre la douleur inflammatoire et son effet antinociceptif peut être synergique avec celui d'anti-inflammatoires non stéroïdiens injectés localement (Guindon *et al.* 2006). Finalement, dans un modèle de douleur inflammatoire viscérale, des endocannabinoïdes ont atténué l'hyperalgésie référée suite à l'inflammation de la vessie causée par l'injection de turpentine (Farquhar-Smith et Rice 2001).

Les propriétés anti-inflammatoires des cannabinoïdes, notamment par activation du récepteur CB<sub>2</sub>, peuvent prendre part à l'effet analgésique des cannabinoïdes. Ainsi, toujours suite à une injection de carragénine dans la patte chez le rat, le cannabidiol a non seulement diminué le comportement douloureux des animaux mais a également diminué la production de prostaglandine E2 (PGE2), l'activité de la cyclooxygénase, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène ainsi que la production de monoxyde d'azote (NO) dans la patte (Conti *et al.* 2002; Costa *et al.* 2004, a). En outre, suite à l'injection intradermique de capsaïcine ou de carragénine, un agoniste spécifique du récepteur CB<sub>2</sub> a supprimé l'hyperalgésie liée à l'inflammation, que ce soit suite à une administration systémique ou locale (Quartilho *et al.* 2003; Hohmann *et al.* 2004). (Voir également (Pertwee 2005) pour une revue de la littérature).

### 1.6.3.3. Cannabinoïdes et douleur neuropathique

Le phénomène de douleur neuropathique sera évoqué dans les chapitres suivants. Cependant, nous allons ici mentionner certaines études révélant un effet analgésique des cannabinoïdes dans ce type de douleur qui est due à un dysfonctionnement des voies nerveuses impliquées dans la transmission de l'information nociceptive. En effet, le cannabinoïde synthétique WIN 55, 212-2 s'est révélé efficace pour supprimer les symptômes de douleur neuropathique dans différents modèles animaux suite à une injection aiguë (Bridges *et al.* 2001, a; Pascual *et al.* 2005) ou répétée (Costa *et al.* 2004, b). D'autres cannabinoïdes ont été évalués et ont également supprimé l'hypersensibilité douloureuse induite par une lésion du nerf sciatique suite à une injection systémique (Fox *et al.* 2001; De Vry *et al.* 2004, a) ou locale au niveau de la patte (Guindon et Beaulieu 2006).

Si dans un certain nombre d'études ces effets semblent mettre en jeu principalement le récepteur CB<sub>1</sub>, il semble néanmoins que l'activation du récepteur CB<sub>2</sub> puisse également diminuer les symptômes de douleur neuropathique (Ibrahim *et al.* 2003; Sagar *et al.* 2005; Valenzano *et al.* 2005; Whiteside *et al.* 2005).

### 1.7. Cannabinoïdes : conclusion

Un rôle important du système cannabinoïde réside dans le potentiel analgésique des composés qui vont activer ce système. En effet, cette fonction est une des plus pertinentes quant aux applications cliniques des cannabinoïdes. D'une part les cannabinoïdes présentent un profil thérapeutique plus sûr que les opioïdes puisqu'ils ne peuvent pas produire d'arrêt respiratoire, même en cas de surdosage, étant donné la faible expression des récepteurs cannabinoïdes dans le tronc cérébral, contrairement aux récepteurs opioïdes. D'autre part, la possibilité de cibler préférentiellement le récepteur CB<sub>2</sub> majoritairement situé à la périphérie ou bien encore l'utilisation de médicaments ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique permettrait d'éviter les effets délétères connus des cannabinoïdes (euphorie ou ivresse cannabique, désorientation spatio-temporelle, troubles de la mémoire...). Nous avons en effet vu que le système cannabinoïde se situait à divers endroits clés de la transmission du message nociceptif, et que l'activation de ce système était efficace dans divers modèles animaux face à différents types de douleur, qu'elle soit aiguë, inflammatoire ou neuropathique. Cette dernière est souvent réfractaire aux traitements conventionnels et c'est la raison pour laquelle la recherche d'une cible pharmacologique supplémentaire est souhaitable. Si en condition normale, l'expression des récepteurs cannabinoïdes est retrouvée à divers endroits clés du système nociceptif, qu'en est-il lors de la douleur neuropathique ? En effet, la chronicité de ce type de douleur est due à la plasticité du système nerveux. Il est de ce fait nécessaire de mieux comprendre l'implication du système cannabinoïde dans la douleur neuropathique.

## 2. Douleur neuropathique

### 2.1. Définition

La douleur neuropathique est une douleur chronique due à un dysfonctionnement du réseau de conduction nerveux impliqué dans la transmission de l'information nociceptive que ce soit au niveau central ou périphérique. Les causes sont multiples allant d'une lésion traumatique à une infection ou encore à un trouble métabolique (voir **Tableau II** p.22).

Les symptômes cliniques rencontrés peuvent aller de l'hypoesthésie (diminution de la perception d'un stimulus) à un état d'hyperexcitabilité du système nerveux. Dans ce cas, apparaît alors de l'allodynie (douleur produite par un stimulus non douloureux), de l'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux), de l'hyperesthésie (augmentation de la perception d'un stimulus) ou encore de la dysesthésie (sensation anormale, déplaisante et non douloureuse). La douleur peut être soit évoquée (par un stimulus) soit spontanée de manière continue ou paroxystique (Boulanger 2005).

Origine	Centrale	Périphérique		Mixte (centrale et périphérique)
		Mononeuropathie	Polyneuropathie	
Métabolique/ endocrinienne		Diabète	Diabète Insuffisance rénale	
Nutritionnelle			Déficiences en vitamine	
Infectieuse	Myélopathie du VIH	Herpès zoster	VIH	
Toxique			Alcool Métaux lourds	
Médicamenteuse			Chimiothérapie Antiviraux	
Néoplasique	Compression ou envahissement tumoral	Compression ou envahissement tumoral		
Traumatique	Traumatisme médullaire ou crânien	Section nerveuse post-chirurgicale		Membre fantôme CRPS
Vasculaire	ACV		Ischémie périphérique Vasculites	
Compression	Compression de la moelle épinière ou des racines	Tunnel carpien		
Autres	SEP Myélopathie post- radique	Névralgie du trijumeau Guillain-Barré Plexopathie post- radique		

**Tableau II :** Exemples de pathologies pouvant causer une douleur neuropathique. (VIH : virus d'immunodéficience humaine; CRPS : *Complex Regional Pain Syndrome*; ACV : accident cérébrovasculaire; SEP : sclérose en plaque) D'après (Boulanger 2005).

## **2.2. Mécanismes de la douleur neuropathique**

La douleur neuropathique n'est pas une entité unique, puisqu'elle peut résulter de diverses causes (lésions mécaniques, désordre métabolique, infection virale), provoquant alors un dysfonctionnement du système nerveux central ou périphérique impliqué dans la transmission et le traitement de l'information nociceptive. Le cas le plus étudié est celui de douleur neuropathique faisant suite à une lésion nerveuse périphérique. Même dans ce cas cependant, il peut se produire des changements tant au niveau central que périphérique qui vont participer au phénomène de douleur neuropathique. Après une étude des mécanismes centraux, nous verrons quels mécanismes surviennent au niveau périphérique.

### **2.2.1. Mécanismes au niveau central**

#### *2.2.1.1. Niveau cérébral*

Suite à une lésion nerveuse périphérique, des modifications dans le cerveau peuvent être observées dans le cas de douleur neuropathique. Par exemple, dans le cas de douleur du membre fantôme suite à une amputation, des réorganisations du cortex moteur et sensoriel sont observées (Karl *et al.* 2001). Ces réorganisations ne sont pas observées chez des patients n'ayant pas de douleur malgré un phénomène de membre fantôme et également chez les personnes n'ayant pas de membre de façon congénitale (Flor *et al.* 1998). Lors d'une étude de cas, il a été montré par imagerie à résonance magnétique fonctionnelle que la douleur neuropathique suite à une lésion nerveuse périphérique est en partie due à un arrêt de l'inhibition de la nociception provoqué par les changements dans le système nerveux central (Hofbauer *et al.* 2006). Malgré tout, on connaît très peu l'implication de ces changements cérébraux dans la douleur neuropathique.

### 2.2.1.2. Niveau spinal

#### 2.2.1.2.1. Réorganisation anatomique

Après une lésion nerveuse périphérique, il a été proposé qu'une réorganisation anatomique se mettait en place dans la moelle épinière pouvant en partie expliquer les symptômes de la douleur neuropathique tels que l'allodynie et l'hyperalgésie. En effet, dans des conditions normales, les fibres afférentes nociceptives (fibres C et A $\delta$ ) font globalement synapses au niveau des couches superficielles (I et II) de la corne dorsale de la moelle épinière alors que les fibres myélinisées de plus gros diamètre (fibres A $\beta$  du toucher) forment des synapses au niveau des couches III, IV, V (la couche V reçoit également des afférences A $\delta$ ) et VI. Or, suite à une lésion du nerf sciatique, les terminaisons centrales des fibres de large diamètre vont innover la couche II (Woolf *et al.* 1992; Koerber *et al.* 1994). Ainsi, lorsque qu'un stimulus de faible intensité stimule les fibres A $\beta$ , les neurones de second ordre de la voie nociceptive sont excités. Ceci a été confirmé par des études électrophysiologiques : Après une section du nerf sciatique, la majorité des potentiels post-synaptiques excitateurs enregistrés dans les neurones de la couche II étaient induits par des stimuli de faible intensité contrairement aux témoins (Kohama *et al.* 2000).

Cependant, cette théorie ne semble pas confirmée. En effet, il est possible que les changements considérés comme anatomiques soit plutôt de l'ordre d'un changement phénotypique des fibres C. En effet, les premières études utilisaient un traceur rétrograde se liant à un marqueur des cellules de large diamètre, le ganglioside GM1. Après une lésion nerveuse, le traceur était trouvé dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière, suggérant ainsi une innervation des fibres de large diamètre dans les couches I et II. Or suite à une lésion nerveuse, les fibres C subissent un changement phénotypique pouvant expliquer leur marquage par le traceur. Ainsi, plupart des fibres marquées seraient des fibres C. Il existe cependant une faible portion de fibres A $\beta$  pouvant innover la couche II de la moelle épinière, mais il semble que ce mécanisme d'innervation



soit moins important dans la douleur neuropathique (Höckfelt *et al.* 2006). En outre, ce mécanisme ne peut expliquer qu'en partie le phénomène d'allodynie puisque qu'il ne survient qu'à partir de deux semaines après la lésion.

#### 2.2.1.2.2. Hyperexcitabilité

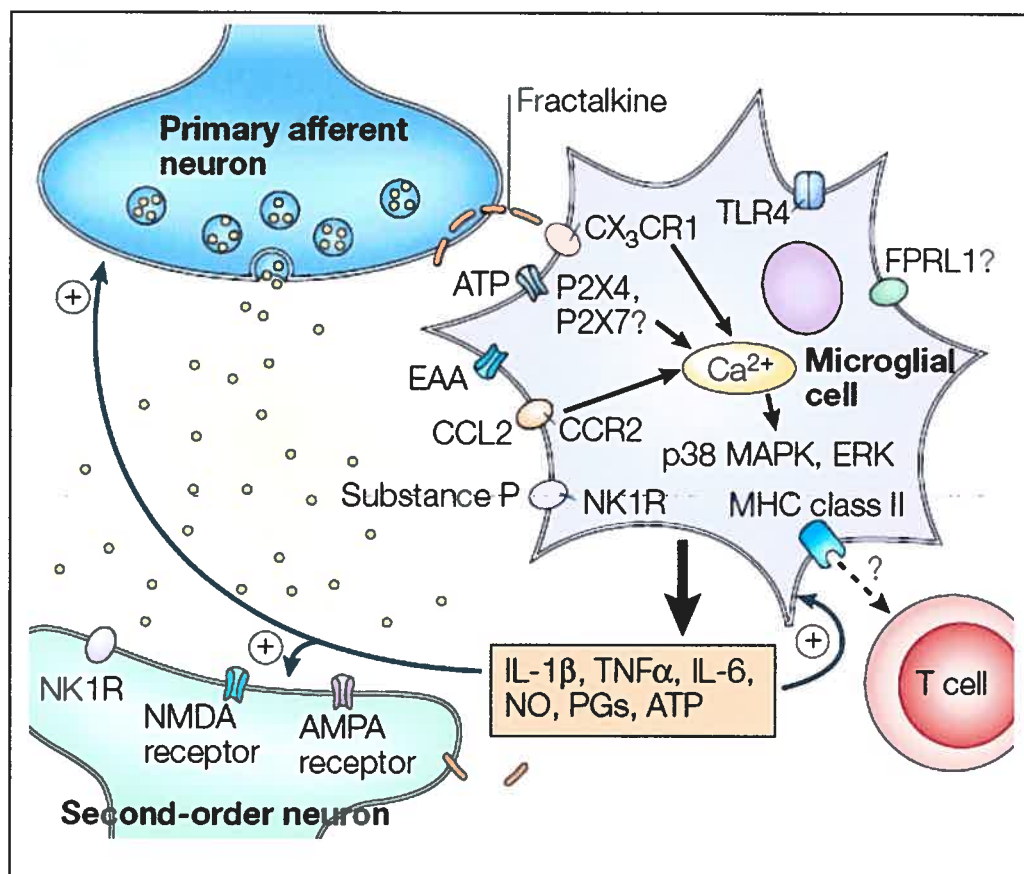
En réponse à une augmentation des décharges des fibres C apparaît un phénomène dénommé « *wind-up* » principalement dans les neurones nociceptifs non spécifiques de la moelle épinière. Ce phénomène participe entre autres à l'hyperexcitabilité de la moelle épinière et ferait notamment entrer en jeu les récepteurs NMDA du glutamate (Herrero *et al.* 2000). Ces récepteurs canaux sont bloqués en condition normale par un ion magnésium ( $Mg^{2+}$ ). Lorsque la cellule post-synaptique est dépolarisée de façon soutenue, par exemple suite à la libération de substance P des fibres C venant activer les récepteurs de la neurokinine 1 (NK1) ou du glutamate sur les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole), l'ion  $Mg^{2+}$  ne bloque plus le récepteur NMDA et la cellule devient alors encore plus sensible à une libération de glutamate dans l'espace synaptique (Rang *et al.* 2003, a). L'implication du *wind-up* dans la douleur neuropathique est encore à éclaircir étant donné qu'il a une durée relativement courte comparée à la sensibilisation due à la neuropathie. Cependant, plusieurs études ont montré que le blocage des récepteurs NMDA pouvait améliorer les symptômes de douleur neuropathique dans des études animales (Qian *et al.* 1996; Suzuki *et al.* 2001) ou cliniques (Nikolajsen *et al.* 1996). Le récepteur NMDA possède un site de liaison à la glycine favorisant son activation. Bloquer la liaison de la glycine semble diminuer l'allodynie dans les modèles animaux de douleur neuropathique (Martinez *et al.* 2002; Christoph *et al.* 2005) mais une étude clinique récente n'a pu démontrer la même efficacité (Wallace *et al.* 2002). La manière dont le récepteur NMDA contribue à la maintenance de la douleur neuropathique n'est que très peu connue. La concentration de calcium intracellulaire et l'activation de la PKC (protéine kinase C) semblent intervenir dans le processus d'hyperexcitabilité spinale (Bridges *et al.* 2001, b). Une étude récente a montré que le gène Homer1a (récemment découvert comme ayant un

rôle dans la plasticité synaptique) était exprimé dans la moelle épinière suite à une constriction du nerf sciatique. Cette expression était diminuée par un traitement avec le MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA. Il semble donc que l'hyperexcitabilité induite par les récepteurs NMDA provoque l'induction du gène Homer1a, qui, en facilitant la plasticité synaptique dans la moelle épinière, contribuerait aux changements à long terme impliqués la douleur neuropathique (Miyabe *et al.* 2006).

Dans le système nerveux central, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est un des plus importants neurotransmetteurs inhibiteurs. Il existe deux types de récepteurs du GABA : GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. Ainsi, l'administration de bicuculline (un antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub>) par voie intrathécale induit de l'allodynie de façon dépendante de la dose (Yaksh 1989). Des animaux neuropathiques traités avec des agonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub> montrent moins d'allodynie (Hwang et Yaksh 1997; Rode *et al.* 2005). L'expression de ces deux récepteurs est augmentée lors de lésion nerveuse périphérique (Yang *et al.* 2004; McCarson *et al.* 2005) bien que d'autres résultats montrent que l'expression du récepteur GABA<sub>B</sub> n'est pas modifiée dans un autre modèle de douleur neuropathique (Engle *et al.* 2006). Il semble que l'allodynie observée soit due à une diminution de libération de GABA : les niveaux de GABA extracellulaire sont diminués dans la moelle épinière lombaire d'animaux neuropathiques (Stiller *et al.* 1996). Cette diminution serait due à une diminution de l'expression du transporteur de GABA (GAT-1) suite à la lésion neuropathique contribuant ainsi à une déplétion de GABA des terminaisons nerveuses (Miletic *et al.* 2003).

Plusieurs types de cellules non-neuronales (astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales) sont présents dans le système nerveux central. Les cellules microgliales expriment les mêmes marqueurs de surface que les macrophages en périphérie et correspondent à des cellules immunitaires du système nerveux. Ces cellules sont activées suite à une lésion du système nerveux, une infection ou certains cas de douleur comme la douleur neuropathique. Des inhibiteurs du métabolisme de la microglie et des astrocytes

sont capables de bloquer le développement ou de renverser l'état de douleur neuropathique (Meller *et al.* 1994; Milligan *et al.* 2003). Il semble en fait que la microglie soit responsable de l'initiation mais non du maintien de la douleur neuropathique puisque la minocycline (un inhibiteur spécifique de la microglie) empêche le développement de la douleur neuropathique, mais n'a pas d'effet sur la douleur déjà présente (Raghavendra *et al.* 2003). L'implication des cellules microgliales dans l'hyperexcitabilité spinale s'explique par le fait qu'un fois activée ces cellules vont libérer dans l'espace extracellulaire plusieurs molécules pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor- $\alpha$* , IL-6 : interleukine-6, NO : monoxyde d'azote, ATP : adénosine tri-phosphate, PGs : prostaglandines). Ces molécules vont alors favoriser la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique ou vont augmenter l'excitabilité post-synaptique. Elles vont également induire la prolifération des cellules microgliales de façon autocrine. Il a été récemment montré que le récepteur P2X<sub>4</sub> était surexprimé sur les cellules microgliales du côté ipsilatéral à une lésion nerveuse induisant de la douleur neuropathique. L'activation de ces récepteurs à l'ATP semble nécessaire et suffisante pour produire de l'allodynie mécanique chez les rats (Tsuda *et al.* 2003). La microglie activée ainsi par l'ATP va libérer du BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) qui est responsable de l'inversion de la polarité des courants activés par le GABA dans la couche I de la corne dorsale de la moelle épinière. Cette inversion de gradient anionique serait responsable de l'hyperexcitabilité observée dans les neurones de la couche I de la corne dorsale de la moelle épinière (Coull *et al.* 2005). Voir également **Figure 6** p. 29 et (Marchand *et al.* 2005) pour une revue de la littérature.



**Figure 6 :** Événements spinaux survenant après une lésion nerveuse périphérique. La terminaison du neurone afférent primaire est entourée de cellules microgliales qui surveillent et maintiennent l'environnement dans la moelle épinière. Suite à une lésion nerveuse périphérique, la microglie sera activée (probablement par les neurotransmetteurs du neurone afférent primaire) et va libérer plusieurs substances (cytokines, chemokines) pro-inflammatoires aboutissant à une augmentation de l'activité synaptique. (AMPA : *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*, CX3CR1 : récepteur de la fractaline, EAA : acides aminés excitateurs, ERK : *extracellular signal-regulated kinase*, FPLRL1 : *formyl peptide receptor-like 1*, MHC : complexe majeur d'histocompatibilité, NK1R : récepteur de la neurokinine 1, NMDA : N-méthyl-D-aspartate, P2X : récepteur à l'ATP, TLR4 : *Toll-like receptor 4*). Reproduit d'après (Marchand *et al.* 2005).

### 2.2.2. Mécanismes périphériques

Suite à une lésion nerveuse périphérique, pratiquement tous les changements observés au niveau central, que ce soit dans la moelle épinière ou le cerveau, sont dus aux nombreux changements pathophysiologiques apparus dans le système nerveux périphérique. Ces changements comprennent une hyperexcitabilité des neurones afférents primaires et aussi des décharges spontanées. Divers facteurs entrent en compte dans ces mécanismes périphériques. La compréhension des mécanismes périphériques est donc d'une très grande importance étant donné leur rôle dans l'étiologie de la maladie.

#### 2.2.2.1. Décharges ectopiques

Contrairement à une situation normale où il est très rare de rencontrer des décharges spontanées dans les neurones afférents primaires, une lésion nerveuse périphérique entraîne une augmentation des décharges spontanées et des décharges évoquées. Ces décharges sont appelées ectopiques car elles sont produites à un endroit anormal. Elles peuvent provenir du névrome dû à la lésion nerveuse ou bien encore de différents endroits le long du neurone afférent primaire, tels que le ganglion rachidien ou des fibres distales au névrome (Wall et Gutnick 1974; Wall et Devor 1983; Chen et Devor 1998; Amir *et al.* 2005). Cette augmentation d'excitabilité intrinsèque aux fibres nerveuses périphériques est notamment due à une augmentation de l'expression de canaux sodiques sensibles au voltage ( $Na_v$ ). Il existe plusieurs types de canaux sodiques (la nomenclature allant de  $Na_v1.1$  à  $Na_v1.9$ ). Parmi ceux-ci, deux types semblent impliqués dans le phénomène d'hyperexcitabilité : le canal  $Na_v1.3$  et le canal  $Na_v1.8$ . Concernant le premier cité, alors qu'il est très faiblement exprimé dans le système nerveux périphérique adulte, son expression augmente après une lésion du nerf sciatique (Waxman *et al.* 1994; Kim *et al.* 2001). En outre, ses propriétés biophysiques correspondent aux décharges rapides spontanées observées dans le cas de douleur neuropathique. Le canal  $Na_v1.8$ , voit lui son expression globale diminuer dans les ganglions rachidiens mais il s'accumule au site de lésion nerveuse périphérique et participe

ainsi à la formation de décharges ectopiques. Ce canal est particulièrement intéressant car il est exclusivement exprimé dans les neurones ayant des fibres de petit diamètre. Des études faites avec des souris dont le gène encodant le canal  $\text{Na}_v1.8$  a été invalidé montrent que ce canal est nécessaire au développement de décharges ectopiques (Roza *et al.* 2003). Voir également (Birch *et al.* 2004; Devor 2006) pour une revue de la littérature.

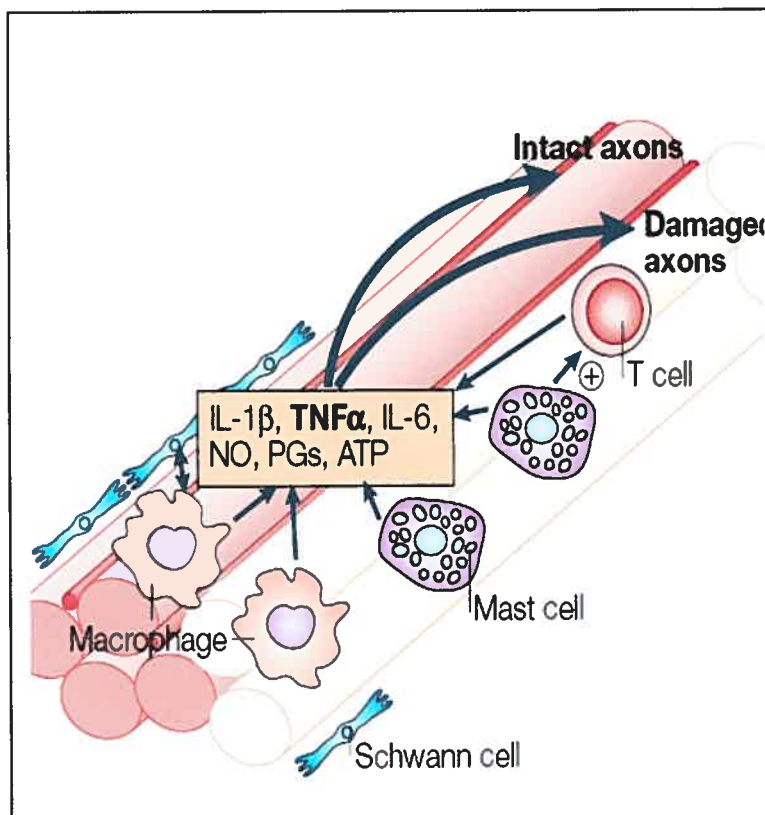
Des changements dans l'expression d'autres canaux ioniques peuvent également expliquer les modifications d'excitabilité des neurones afférents primaires. Ainsi, les courants du canal calcium sensible au voltage  $\text{Ca}_v2.2$  (type N) est modifié dans les ganglions rachidiens suite à une lésion nerveuse périphérique (Yaksh 2006). Le blocage de ce canal peut supprimer les symptômes de douleur neuropathique (Winqvist *et al.* 2005).

#### 2.2.2.2. Conduction éphaptique

Alors que dans une situation normale, les neurones afférents primaires sont isolés les uns des autres, lorsque le nerf périphérique est lésé, il peut se produire des communications croisées entre les différents types de fibre du toucher ( $\text{A}\beta$ ) ou nociceptives ( $\text{A}\delta$ , C). Ces conversations croisées (ou éphaptiques) peuvent survenir au niveau du névrome (Seltzer et Devor 1979; Amir et Devor 1992). La même équipe a pu montrer qu'il y avait une communication croisée entre les neurones afférents primaires dans le ganglion rachidien. À cet endroit, la nature de la transmission entre les fibres peut être de nature chimique (Amir et Devor 1996), électrique (Amir et Devor 2000) ou anatomique avec l'innervation de fibres de petit diamètre formant des anneaux autour des fibres de gros diamètre (McLachlan et Hu 1998). On comprend alors que ce phénomène de conduction éphaptique puisse engendrer de l'allodynie étant donné que la stimulation d'une fibre du toucher ( $\text{A}\beta$ ) par un stimulus approprié peut entraîner l'excitation des fibres nociceptives.

### 2.2.2.3. Rôle du système immunitaire

À l'instar de l'implication des cellules microgliales dans la moelle épinière, le système immunitaire est également impliqué dans l'hyperexcitabilité du système nerveux périphérique suite à une lésion nerveuse. Ainsi, comme dans tout tissu endommagé, les macrophages sont recrutés au niveau du nerf lésé. Les macrophages activeraient les cellules de Schwann par l'intermédiaire de l'interleukine-1 $\beta$  provoquant des changements dans ces cellules qui synthétisent alors de nombreuses molécules dont le facteur de croissance nerveux (NGF) et le TNF- $\alpha$ . Ce dernier peut activer directement les nocicepteurs ou les sensibiliser indirectement via les prostaglandines. D'autres cellules immunitaires telles que les mastocytes ou lymphocytes T sont retrouvés au site de lésion ou dans les ganglions rachidiens, mais leur rôle dans la douleur neuropathique n'est pas clairement élucidé. (Voir **Figure 7** et (Marchand *et al.* 2005) pour une revue de la littérature).



Reproduit d'après Marchand *et al.* (2005)

**Figure 7 :** Changements survenant au niveau axonal suite à une lésion nerveuse périphérique. Les macrophages, cellules de Schwann, mastocytes et lymphocytes T vont libérer des facteurs pro-inflammatoires. Les prostaglandines et le TNF- $\alpha$  sont les principaux responsables des modifications sensorielles. (IL : interleukine, NO : monoxyde d'azote, TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ , PG: prostaglandines, ATP: Adénosine triphosphate)

#### 2.2.2.4. Repousse axonale

Après la lésion du nerf sciatique, il a été montré que les fibres du nerf saphène intact adjacent peuvent innerver les zones atteintes par la dégénération Wallerienne des fibres du nerf sciatique. Cette innervation collatérale est ensuite remplacée par celle du nerf original (Devor *et al.* 1979). Cependant ce phénomène ne serait pas corrélé avec la sévérité de l'hyperalgésie (Kingery et Vallin 1989). Néanmoins, il semble que le NGF soit déterminant dans ce phénomène de repousse axonale collatérale (Ro *et al.* 1999). On connaît peu de chose sur la sensibilité des terminaisons nerveuses qui ont repoussé, qu'elles viennent de repousses collatérales ou du nerf lésé. Une étude faite chez le chat a montré une augmentation de la réponse nociceptive suite à une stimulation mécanique des nocicepteurs ayant repoussé du nerf tibial sectionné (Andrew et Greenspan 1999).

#### 2.2.2.5. Association entre le système sympathique et le système nerveux sensoriel

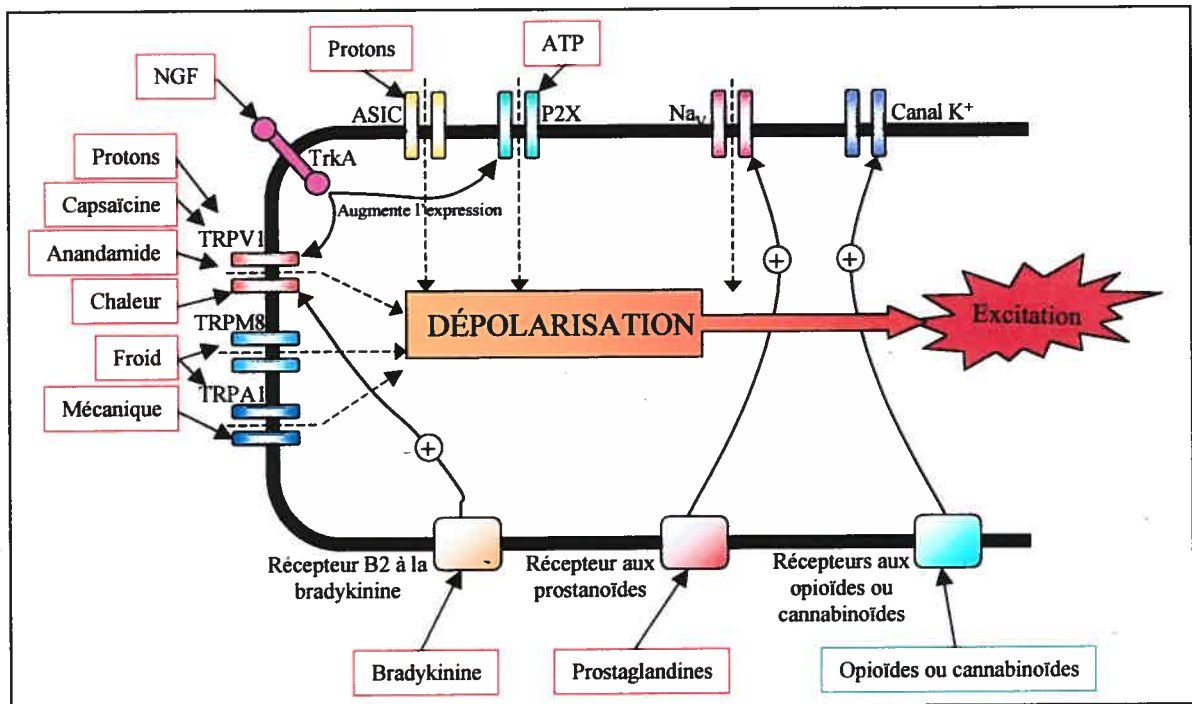
Suite à une lésion nerveuse périphérique, il existe également un remodelage anatomique des fibres autonomiques sympathiques. Celles-ci vont innerver les ganglions rachidiens et former des « paniers » de terminaisons noradrénergiques autour des corps cellulaires des neurones afférents primaires de gros diamètre (McLachlan *et al.* 1993). Un remodelage des fibres sympathiques peut également survenir plus en périphérie (Ruocco *et al.* 2000; Grelik *et al.* 2005). L'association peut être indirecte via la libération de messagers des fibres sympathiques tels que la noradrénaline ou l'ATP qui augmenteront l'excitabilité des fibres nerveuses périphériques (Moalem *et al.* 2005). Une association directe est supportée par les données anatomiques montrant une innervation des ganglions rachidiens par des fibres sympathiques ainsi que par des données électrophysiologiques (Devor *et al.* 1994; Michaelis *et al.* 1996). Cette innervation sympathique est proportionnelle au nombre de fibres lésées, mais n'est pas corrélée avec le niveau d'hyperalgésie rencontré (Kim *et al.*



2001, b). De plus, l'innervation sympathique ne semble pas nécessaire au développement de la douleur neuropathique (Kim *et al.* 1999). Toutefois, il semble que ce phénomène d'association entre les fibres sympathiques et les fibres nerveuses sensorielles participe au syndrome de douleur régionale complexe (CRPS) rencontré en clinique (Wasner *et al.* 2001). Voir également Janig et Baron (Janig et Baron 2003) pour une revue de la littérature.

#### 2.2.2.6. Sensibilisation des nocicepteurs

Les nocicepteurs répondent à une grande variété de stimuli par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs, canaux ou autres molécules de transduction du signal. (voir **Figure 8**)



**Figure 8** : Récepteurs, canaux et mécanismes de transduction des terminaisons des neurones afférents primaires. Seuls les principaux sont montrés. (ASIC : *acid sensitive ionic channel*, ATP : adénosine triphosphate, P2X : récepteur purinergique, TRP: *transient receptor potential*, NGF : facteur de croissance neuronal, TrkA Récepteur à activité tyrosine kinase. Encadrements rouges : médiateurs excitateurs, verts : inhibiteurs). Modifié d'après (Rang *et al.* 2003, b).

Les fibres nerveuses afférentes primaires montrent une plus grande sensibilité à l'ATP après une lésion nerveuse périphérique, ce phénomène passerait par l'intermédiaire des récepteurs P2X (Zhou *et al.* 2001). Parmi les récepteurs purinergiques, le récepteur P2X3 (sous forme homomérique ou hétéromérique P2X2/3) est exprimé dans les fibres afférentes primaires. Un traitement avec un antagoniste peut supprimer les symptômes de la douleur neuropathique (Jarvis 2003; McGaraughty *et al.* 2003). L'expression du récepteur P2X3 est diminuée dans les ganglions rachidiens après une ligature des nerfs spinaux (Kage *et al.* 2002), mais il semblerait que le récepteur canal lui-même soit plus sensible à l'ATP dans des conditions de douleur neuropathique (Chen *et al.* 2005).

Le récepteur TRPV1, sensible à la chaleur nociceptive, est normalement exprimé par les fibres C. Or dans le cas de lésion nerveuse périphérique ou de neuropathie diabétique, l'expression du récepteur TRPV1 se voit augmentée notamment dans les fibres A myélinisées (Hudson *et al.* 2001; Fukuoka *et al.* 2002; Rashid *et al.* 2003, a,b). Ce phénomène pourrait expliquer la sensibilisation des récepteurs. Des traitements par des antagonistes du récepteur TRPV1 suppriment en effet l'allodynie ou l'hyperalgésie dans des études animales (Walker *et al.* 2003; Honore *et al.* 2005; Culshaw *et al.* 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules immunitaires libèrent des médiateurs de l'inflammation qui peuvent activer les nocicepteurs et les sensibiliser. Les récepteurs de la bradykinine jouent un rôle important dans la nociception et dans le phénomène de douleur inflammatoire (Couture *et al.* 2001). En plus de ce phénomène qui se produit également lors de la douleur inflammatoire, les fibres nerveuses sensorielles vont surexprimer les récepteurs aux médiateurs de l'inflammation tels que les récepteurs B1 et B2 de la bradykinine lors de la douleur neuropathique (Petersen *et al.* 1998; Levy et Zochodne 2000). Cependant une étude par imagerie calcique n'a pas révélé d'activation du récepteur B1 dans les neurones des ganglions rachidiens des animaux neuropathiques (Brand *et al.* 2001). En outre, on observe une augmentation des sites de liaison pour des agonistes du récepteur B2 au niveau des couches superficielles de la moelle épinière chez

des animaux ayant une neuropathie diabétique (Campos *et al.* 2005). Également, l'expression du récepteur du NGF, TrkA, est augmentée dans les repousses axonales (Grelik *et al.* 2005). Ce phénomène participe à la repousse axonale mais pourrait également favoriser la sensibilisation des récepteurs néoformés.

## 2.3. Systèmes opioïdes et cannabinoïdes

La douleur neuropathique résulte d'un déséquilibre entre les mécanismes pronociceptifs et antinociceptifs. Alors que les effets pronociceptifs viennent d'être mentionnés, qu'advient-il de deux des plus importants systèmes biologiques de contrôle de la douleur que sont les systèmes opioïde et cannabinoïde ?

### 2.3.1. Récepteurs opioïdes

Jusqu'à présent, quatre types de récepteurs opioïdes ont été découverts. Il s'agit des récepteurs  $\mu$  (MOR ou MOP),  $\delta$  (DOR ou DOP),  $\kappa$  (KOR ou KOP) et d'un dernier découvert par homologie de séquence : le récepteur ORL-1 (*opioid receptor-like 1*) (NOR ou NOP) (Mollereau *et al.* 1994).

Parmi les récepteurs opioïdes classiques (MOR, DOR, KOR), le récepteur MOR a été le plus étudié étant donné qu'il est le principal médiateur de l'activité des opioïdes utilisés couramment (morphine, codéine, méthadone, fentanyl...) (Chauvin et Beaulieu 2005). Diverses études d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ* ou d'autoradiographie ont révélé que l'expression du récepteur MOR dans la moelle épinière était diminuée suite à une lésion nerveuse périphérique (Besse *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1998; Kohno *et al.* 2005). La diminution de son expression à la surface des cellules peut-être expliquée par une augmentation de la phosphorylation (notamment de la Sérine 375) du récepteur, nécessaire à son internalisation (Narita *et al.* 2004). Une étude faite par RT-PCR a montré que les niveaux d'ARNm de MOR étaient diminués dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière d'animaux neuropathiques expliquant également une diminution de l'expression de

MOR (Pol *et al.* 2006). Globalement, les études montrent donc une diminution de l'expression de MOR, mais il est possible de voir une augmentation au site de la lésion nerveuse périphérique (Truong *et al.* 2003). Concernant les récepteurs DOR et KOR, une diminution de DOR a été observée dans trois modèles de douleur neuropathique effectués sur le nerf sciatique (Stone *et al.* 2004) alors qu'une augmentation de l'ARNm de KOR dans les ganglions rachidiens est associée à l'allodynie mécanique chez la souris (Sung *et al.* 2000).

Il est à noter également que la cholécystokinine (CCK) semble jouer un rôle dans la douleur neuropathique en agissant sur le système opioïde. En effet, la CCK et ses récepteurs sont considérés comme inhibiteurs du système opioïde. L'expression de CCK est augmentée dans les neurones afférents primaires en condition neuropathique. Ce phénomène semblerait diminuer le contrôle endogène de la douleur par les opioïdes puisque lorsqu'administrée directement, la CCK ne modifie pas les seuils de douleur. Voir (Dickenson et Suzuki 2005) pour une revue de la littérature.

Concernant le récepteur ORL-1, il n'avait pas de ligand connu jusqu'à la découverte de la nociceptine (ou Orphanine FQ) (Meunier *et al.* 1995; Reinscheid *et al.* 1995). En effet, les autres opioïdes n'ont aucune affinité pour ce récepteur. Le récepteur ORL-1 jouerait un faible rôle dans le système nociceptif en conditions normales (Chauvin et Beaulieu 2005). En revanche, suite à une lésion nerveuse chez le rat, l'ARNm de ORL-1 est augmenté dans la moelle épinière (Briscini *et al.* 2002) et dans certaines zones du cerveau telles que la substance grise périaqueducale et le noyau du raphé magnus (Ma *et al.* 2005). Une étude a montré que l'injection d'un agoniste pour le récepteur ORL-1 n'avait pas d'effet sur la nociception de rats normaux mais avait un effet anti-allodynique sur des rats neuropathiques (Obara *et al.* 2005). Cependant, des résultats contraires ont été observés puisqu'un antagoniste a présenté une activité anti-allodynique et anti-hyperalgésique (Tamai *et al.* 2005). Des études plus poussées sont donc à effectuer notamment en sachant que ce récepteur interagirait avec les récepteurs opioïdes classiques. En effet, un

antagoniste du récepteur ORL-1 est susceptible d'augmenter l'effet analgésique de la morphine contre la douleur neuropathique (Mika *et al.* 2004).

### 2.3.2. Récepteurs cannabinoïdes

Contrairement au système opioïde, les récepteurs cannabinoïdes ne sont pas moins exprimés au cours de la douleur neuropathique. Une rhizotomie ne provoque que peu de changements dans l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> dans la moelle épinière (Farquhar-Smith *et al.* 2000). Il n'existe en réalité que très peu d'études ayant évalué l'expression des récepteurs cannabinoïdes suite à une lésion nerveuse périphérique. Toutes les études effectuées jusqu'à présent ont révélé une augmentation de l'expression de ces récepteurs.

Concernant le récepteur CB<sub>1</sub>, une des premières études à montrer une augmentation de son expression a été effectuée par Siegling et ses collaborateurs (Siegling *et al.* 2001). Ils ont démontré par RT-PCR que l'ARNm du récepteur CB<sub>1</sub> est augmenté dans le thalamus suite à une lésion de la branche tibiale du nerf sciatique. Au niveau de la moelle épinière, suite à une lésion du nerf sciatique, il a été montré par immunobuvardage de type Western et par immunohistochimie que l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> augmente progressivement suite à la lésion nerveuse et en particulier du côté ipsilatéral à la chirurgie (Lim *et al.* 2003). En revanche, on ne connaît rien de l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> en condition neuropathique à la périphérie que ce soit dans le ganglion rachidien ou le territoire cutané où se situent les terminaisons nerveuses.

Quant au récepteur CB<sub>2</sub>, là encore on connaît très peu de chose sur son expression en condition neuropathique. Une étude par hybridation *in situ* a révélé que l'ARNm du récepteur CB<sub>2</sub> était surexprimé au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière du côté ipsilatéral suite à une lésion du nerf sciatique. Il s'agirait d'une augmentation dans les cellules microgliales (Zhang *et al.* 2003). Enfin, une étude récente a démontré par immunohistochimie que la densité de récepteurs CB<sub>2</sub> augmente dans les couches superficielles de la moelle épinière, dans les neurones des ganglions rachidiens mis

en culture ainsi que dans les fibres du nerf sciatique préalablement lésé (Wotherspoon *et al.* 2005).

## 2.4. Traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique

Alors que pendant longtemps les opioïdes ont été considérés comme inefficaces dans le traitement de la douleur neuropathique, le contraire a été démontré clairement dans plusieurs études cliniques (Benedetti *et al.* 1998; Rowbotham *et al.* 2003). Il semble néanmoins que les doses nécessaires soient plus élevées pour soulager les patients, ce qui serait expliqué par les diminutions d'expression ou de fonctionnalité que nous avons mentionnées précédemment. Malgré cela, le traitement de la douleur neuropathique repose également sur l'utilisation de coanalgésiques, qui sont des molécules faisant partie d'une autre classe médicamenteuse que les analgésiques bien qu'ayant des propriétés analgésiques. Il peut s'agir des antidépresseurs, des anticonvulsivants, des antiarythmiques, des sympatholytiques... Les antidépresseurs tels que l'amitriptyline et les anticonvulsivants avec la gabapentine font partie avec les opioïdes de la médication de première ligne contre les douleurs neuropathiques. Malgré les traitements existants, la douleur neuropathique n'est soignée que partiellement puisque seulement une portion des patients (40 à 50 %) voit sa douleur soulagée par les traitements actuels d'autant qu'une amélioration de 30 à 40 % de la douleur est considérée comme une bonne réponse au traitement. Voir (Boulanger 2005) pour une revue détaillée sur la médication utilisée contre la douleur neuropathique.

### 2.4.1. Amitriptyline

L'amitriptyline fait partie de la famille des antidépresseurs tricycliques capables de bloquer la *recapture* des monoamines (sérotonine et noradrénaline), l'amitriptyline agissant sur les deux transporteurs. Le mécanisme par lequel l'amitriptyline a un effet analgésique est peu connu. Il est cependant indépendant des effets cliniques primaires, puisque l'effet

analgésique survient à des doses du tiers à la moitié inférieure à celles utilisées dans le traitement des troubles de l'humeur. Le principal effet serait au niveau des voies descendantes inhibitrices (voir **Figure 4**) où les neurotransmetteurs impliqués sont la noradrénaline et la sérotonine. En effet, l'amitriptyline agit en inhibant la *recapture* de ces deux neurotransmetteurs (Pineyro et Azzi 2005). En outre, l'amitriptyline empêcherait la surexpression du récepteur GABA<sub>B</sub> et maintiendrait ainsi une transmission GABAergique normale (McCarson *et al.* 2005). L'amitriptyline peut également bloquer les canaux sodiques (Kalso 2005), calciques (Hamplova-Peichlova *et al.* 2002) et jouer le rôle d'antagoniste des récepteurs NMDA (Eisenach et Gebhart 1995). Voir Pineyro et Azzi (Pineyro et Azzi 2005) pour une revue de la littérature.

#### 2.4.2. Gabapentine

Les anticonvulsivants diffèrent entre eux par leur mode d'action contre la douleur neuropathique. Parmi les principaux sites d'action des anticonvulsivants, la gabapentine a un effet direct sur les récepteurs du GABA et bloque les canaux calciques (c'est d'ailleurs par ce mécanisme que la gabapentine s'est révélé être un anticonvulsivant efficace) (Rang *et al.* 2003, c; Boulanger 2005). Cependant, les mécanismes exacts par lesquels la gabapentine agit sont encore relativement peu connus. Une étude récente a montré que la gabapentine pouvait diminuer la douleur neuropathique en diminuant la libération de glutamate au niveau spinal (Coderre *et al.* 2005). Du fait de son profil thérapeutique relativement sûr (avec peu d'effets indésirables et peu d'interactions médicamenteuses) la gabapentine est un des médicaments de premier choix utilisé contre la douleur neuropathique.

#### 2.4.3. Opioïdes

Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité des opioïdes dans le traitement de la douleur neuropathique (Raja *et al.* 2002; Rowbotham *et al.* 2003). Il est conseillé d'utiliser les opioïdes contre la douleur neuropathique lorsque les coanalgésiques sont peu

efficaces ou lorsque le patient présente une intolérance aux coanalgésiques. Si la douleur neuropathique est particulièrement tenace, l'administration d'opioïdes et de coanalgésiques est recommandée (Boulanger 2005). Le mécanisme d'action analgésique des opioïdes passe principalement par l'activation des récepteurs opioïdes MOR, DOR et KOR. Les récepteurs opioïdes sont couplés à la protéine Gi/o, ayant pour effet une diminution de l'action de l'adénylate cyclase. Les effets cellulaires de l'activation des récepteurs opioïdes et notamment du récepteur MOR sont une inhibition de l'activité neuronale. En effet, la protéine G peut agir directement sur les canaux ioniques ou via la phosphorylation des canaux par PKC et diminuer l'entrée de calcium au niveau présynaptique ce qui réduit la libération de neurotransmetteurs. Au niveau postsynaptique, l'activité des canaux potassiques sera augmentée créant ainsi une hyperpolarisation de la cellule. En outre, la diminution de l'activité de la protéine kinase A diminue l'activité des canaux sodiques sensibles au voltage. Ces effets inhibiteurs réduisent la transmission nociceptive au niveau spinal et périphérique (Chauvin et Beaulieu 2005). Le récepteur MOR est également présent au niveau supraspinal dans les zones impliquées dans la modulation de la douleur (cortex insulaire, hypothalamus, amygdale, substance grise périaqueducule, moelle rostrale ventromédiane, et dans le tegmentum du pons dorsolatéral). L'injection d'agonistes du récepteur MOR à ces divers endroits induit une analgésie. Des neurones de la substance grise périaqueducule contrôlent les cellules de la moelle rostrale ventromédiane. Cette dernière possède deux types de neurones (« on » et « off ») qui ont respectivement un rôle facilitateur ou inhibiteur de la transmission du message nociceptif. Les opioïdes libérés par les neurones de la substance grise périaqueducule peuvent inhiber directement les cellules « on » et bloquer l'inhibition GABAergique agissant sur les cellules « off ». On voit ainsi que c'est également par des mécanismes supraspinaux que les opioïdes peuvent induire une analgésie dans la douleur neuropathique. Voir Fields (2004) pour une revue de la littérature.



#### **2.4.4. Cannabinoïdes**

Nous avons mentionné dans la première partie de cette introduction tous les aspects démontrant le potentiel analgésique des cannabinoïdes. De nombreuses études animales ont révélé que les cannabinoïdes étaient efficaces contre la douleur neuropathique. Une étude clinique a montré qu'un mélange de  $\Delta^9$ -THC et de cannabidiol utilisé en spray (Sativex®) réduisait la douleur neuropathique induite par la sclérose en plaque (Perras 2005). De plus, les conclusions d'une méta-analyse récente portant sur des études cliniques menées depuis 1997 sont que les cannabinoïdes produisent objectivement un soulagement de la douleur neuropathique et qu'ils pourraient représenter un traitement utile dans le cas de douleur neuropathique résistante aux traitements actuels (Corey 2005). Ainsi, le 19 avril 2005 le Sativex® a reçu une autorisation de mise sur le marché au Canada dans le traitement des symptômes neuropathiques liés à la sclérose en plaque.

#### **2.5. Modèles animaux de douleur neuropathique**

Afin de trouver des traitements efficaces, il est nécessaire de mieux connaître la physiopathologie de la douleur neuropathique par des études expérimentales permettant de comprendre plus en détail les mécanismes sous-tendant ce phénomène. Pour des raisons évidentes d'éthique, induire une neuropathie expérimentale chez l'humain n'est pas acceptable. Ainsi, l'utilisation d'animaux (particulièrement des rongeurs : rat et souris) a permis d'obtenir de façon expérimentale et de façon reproductible un syndrome de douleur neuropathique. C'est ainsi que les résultats présentés jusqu'à présent lors de cette introduction proviennent en grande partie d'études effectuées à l'aide de modèles animaux de douleur neuropathique. S'il est évident que les animaux ressentent de la douleur, son évaluation peut s'avérer compliquée par le fait qu'ils ne peuvent exprimer verbalement ce qu'ils perçoivent. De ce fait, on observe souvent de manière indirecte un comportement

douloureux tel qu'un retrait de la queue ou de la patte suite à une stimulation, ce qui est facilement mesurable en laboratoire. La douleur neuropathique expérimentale nécessite une lésion nerveuse. Dans le but de combiner une lésion nerveuse périphérique et une mesure aisée d'un comportement douloureux chez l'animal, les premiers efforts se sont portés sur le nerf sciatique, un nerf mixte (moteur et sensitif) innervant le membre postérieur et relativement accessible.

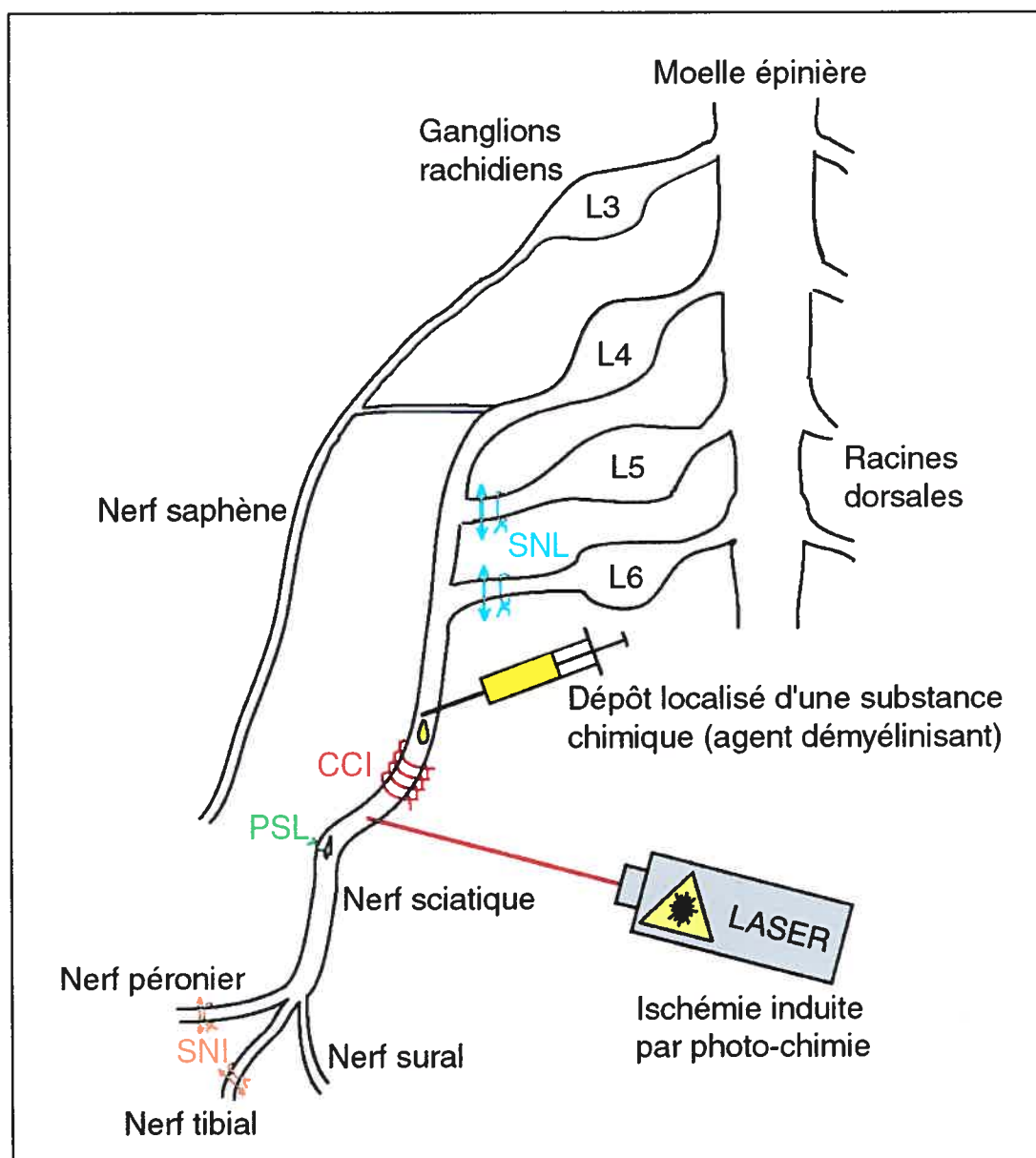
### 2.5.1. Modèles de douleur neuropathique ciblant le nerf sciatique

Une des premières expériences à associer une lésion du nerf sciatique au syndrome de douleur neuropathique telle que la douleur du membre fantôme a été effectuée par Wall et ses collaborateurs (Wall *et al.* 1979). Cette étude révélait qu'une axotomie complète du nerf sciatique entraînait un phénomène d'autotomie (automutilation) au niveau de l'extrémité des membres dont le nerf a été lésé. Ce comportement a été relié à de la douleur neuropathique, mais il est possible que cette automutilation soit reliée à un excès de toilette de l'animal dû à une perte de sensibilité dans la région concernée par la déafférentation nerveuse. Pour des raisons éthiques notamment, ce modèle est plus rarement utilisé bien que certains l'utilisent encore (Wolf *et al.* 2006).

Un peu moins d'une dizaine d'années plus tard, est apparu probablement le modèle le plus utilisé encore actuellement et qui consiste à une constriction chronique du nerf sciatique par des ligatures lâches autour du nerf (CCI pour *Chronic constriction injury*) (Bennett et Xie 1988). Ce modèle a la propriété de laisser une proportion de fibres nerveuses « intactes ». Quelques années plus tard, le modèle de ligature partielle du nerf sciatique a été développé (PSL pour *Partial sciatic nerve ligation*) (Seltzer *et al.* 1990). Ces deux techniques sont toujours assujetties à une variabilité dans la proportion de fibres lésées. C'est pour cette raison que sont apparus des modèles utilisant des ligatures complètes serrées de certaines branches du nerf sciatique en laissant une branche intacte. Ainsi, la ligature des nerfs spinaux L5 et L6 (SNL pour *Spinal nerve ligation*) (Kim et

Chung 1992) et la ligature des nerfs tibial et péronier commun laissant le nerf sural intact (SNI pour *Spared nerve injury*) (Decosterd et Woolf 2000) ont été développés (voir **Figure 9**). Ainsi, ces quatre modèles de lésion mécanique sont les principaux utilisés actuellement. Les animaux présentent tous de l'allodynie et de l'hyperalgésie ainsi qu'une réduction de l'appui sur la patte, celle-ci étant recroquevillée, entraînant alors une claudication du membre touché (Héon 2005).

Il existe d'autres modèles de lésion du nerf sciatique (voir **Figure 9**). Un modèle équivalent à la constriction chronique du nerf sciatique consiste à placer une gaine de polyéthylène autour du nerf. Le diamètre interne de la gaine étant calibré, ce modèle permet de réaliser une lésion nerveuse de façon très reproductible (Mosconi et Kruger 1996). Selon le même principe il est possible de placer un anneau constricteur contenant de l'améroïde qui gonflera en absorbant l'eau et ainsi exercera une pression sur le nerf (Tzabazis *et al.* 2004). L'application focale d'un agent chimique démyélinisant peut également induire des symptômes de douleur neuropathique (Wallace *et al.* 2003). Enfin, suite à l'administration systémique d'un agent photosensible (érythrosine B), il est possible à l'aide d'un laser d'activer cet agent au niveau du nerf sciatique ce qui provoquera localement une thrombose (Kupers *et al.* 1998).



**Figure 9 :** Schéma représentant les principaux modèles animaux de douleur neuropathique sur le nerf sciatique par lésion mécanique : CCI (*chronic constriction injury*), PSL (*partial sciatic nerve ligation*), SNL (*sciatic nerve ligation*), SNI (*spared nerve injury*). Des exemples montrant la possibilité de léser le nerf sciatique par des méthodes non mécaniques sont aussi indiqués. D'après (Kupers *et al.* 1998; Wallace *et al.* 2003; Héon 2005).

### 2.5.2. Autres modèles de douleur neuropathique périphérique

Afin de mimer l'effet de neuropathie induite par une maladie comme le diabète, il est possible de créer des modèles de douleur neuropathique en rendant les animaux diabétiques par exemple par l'injection de streptozotocine qui va détruire les cellules  $\beta$  du pancréas (Aley et Levine 2002). Il est également possible de mimer de la douleur neuropathique induite par le virus de l'herpès en infectant l'animal au niveau du tibia par le virus de l'herpès HSV-1 (Herpes simplex virus-1) (Takasaki *et al.* 2000). De la même manière, des injections systémiques de paclitaxel ou de vincristine (agents anticancéreux) peuvent produire de la douleur neuropathique chez l'animal par un mécanisme qui serait comparable à celui observé chez les patients avec une neuropathie due à un traitement de chimiothérapie (Polomano et Bennett 2001; Polomano *et al.* 2001; Aley et Levine 2002; Flatters et Bennett 2004). D'autres nerfs que ceux innervant le membre postérieur peuvent aussi être visés, tels que différentes branches du nerf trijumeau (Idanpaan-Heikkila et Guilbaud 1999; Grelik *et al.* 2005) ou les racines du nerf caudal (Na *et al.* 1994).

### 2.5.3. Animaux utilisés

La plupart de ces modèles de douleur neuropathique ont été développés initialement chez le rat, mais depuis beaucoup ont été directement adaptés chez la souris. Le transfert du rat à la souris peut-être d'une très grande utilité étant donné les avancées dans la compréhension de la douleur neuropathique que peut fournir l'étude d'animaux transgéniques. Cependant, une souris n'est pas simplement un rat en modèle réduit et il peut y avoir des variations dans les réponses propre à chaque espèce (Bridges *et al.* 2001, b). Par exemple, l'injection de morphine cause un effet sédatif et une augmentation du tonus vagal observés chez le rat mais pas chez la souris (bien que les deux espèces soient sensibles à l'effet analgésique de la morphine) (Le Bars *et al.* 2001, b). Il est ainsi nécessaire de déterminer les caractéristiques du modèle murin que l'on veut développer et ne pas

considérer qu'une adaptation des techniques chirurgicales suffit lorsqu'on souhaite étudier la douleur neuropathique chez la souris.

#### **2.5.4. Mesures de la douleur neuropathique chez les animaux**

Les premières études ont testé la présence de douleur spontanée ou interprétée comme telle (Wall *et al.* 1979; Bennett et Xie 1988). Entre 2000 et 2004, la grande majorité des études utilisant des animaux rendus neuropathiques a utilisé presque uniquement des mesures d'hypersensibilité en testant l'apparition d'allodynie et d'hyperalgésie (90% des études publiées dans la revue *Pain*). Ces deux entités peuvent être quantifiées par des mesures de seuil ou de réponse évoquée par un stimulus (le plus souvent mécanique ou thermique). Ces mesures ont l'avantage d'être aisées à obtenir, elles peuvent être répétées et quantifiées, et enfin, les patients en clinique présentent le même type d'hypersensibilité (Mogil et Crager 2004). Nous allons nous intéresser à des mesures effectuées sur les membres postérieurs étant donné le nombre important de modèles neuropathiques ciblant le nerf sciatique.

##### *2.5.4.1. Mesures de l'hypersensibilité mécanique*

L'application d'un stimulus mécanique peut être progressive ou brutale. Un stimulus progressif aura l'avantage de déterminer un seuil de perception mécanique. Il est souvent déterminé à l'aide de filaments de von Frey (originellement appelés filaments de Semmes-Weinstein) qui sont des filaments de diamètre différents permettant d'appliquer une pression calibrée au point de stimulation. Cette méthode de détermination de seuil permet de quantifier l'allodynie mécanique par la diminution du seuil de perception mécanique. Pour déterminer l'hyperalgésie, il est nécessaire d'appliquer un stimulus douloureux. Il est possible de déterminer l'hyperalgésie mécanique à l'aide d'un filament de von Frey supraliminaire ou encore à l'aide d'une pointe émoussée (*pin-prick test*) (Le Bars *et al.* 2001, a).

#### 2.5.4.2. Mesures de l'hypersensibilité à la chaleur et au froid

La méthode de Hargreaves est la principale méthode utilisée pour évaluer l'hypersensibilité à la chaleur (Hargreaves *et al.* 1988). Cette méthode consiste à détecter automatiquement le retrait de la patte de l'animal suite à une stimulation thermique nociceptive, ce qui permet de quantifier un temps de latence. Ainsi, un temps de latence réduit signifiera que l'animal présentera de l'hyperalgésie thermique. L'utilisation d'une stimulation par un laser permet de ne pas avoir un stimulus croissant, le temps de latence physique étant réduit à sa portion la plus congrue et le temps de latence mesuré restant ainsi très proche de la latence de réaction biologique (Le Bars *et al.* 2001, b).

La mesure de l'hypersensibilité au froid peut se heurter à plusieurs problèmes de définition ou d'interprétation. En effet, parmi les premières études à s'intéresser à la sensibilité au froid, l'allodynie était mesurée à l'aide d'une plaque froide réglée à 4-5°C (Bennett et Xie 1988; Seltzer *et al.* 1990). Or cette température est inférieure au seuil de nociception par le froid considéré être de 15°C (McKemy 2005). Dans ce cas, il devait s'agir d'hyperalgésie au froid et non d'allodynie. Certaines études récentes font la différence, mais la distinction entre les deux n'est pas encore claire (Obata *et al.* 2005; Vissers *et al.* 2005). En outre, la méthode utilisée consiste à placer un animal sur la plaque froide et de quantifier le nombre de fois que l'animal va lever sa patte ou bien le temps de latence avant que l'animal réagisse (Jasmin *et al.* 1998; Allchorne *et al.* 2005). L'équipe de Choi et ses collaborateurs a cependant soulevé le problème que ces évaluations pourraient également dépendre de douleur spontanée exacerbée par le stress thermique que représente le fait de placer un animal sur une plaque froide (Choi *et al.* 1994). Pour passer outre ces problèmes, la même équipe a décidé d'appliquer de l'acétone sur la face plantaire de la patte arrière des animaux. L'acétone en s'évaporant provoque alors une sensation de froid qui n'est pas douloureuse. Ainsi, chez des animaux témoins, contrairement à des animaux neuropathiques, il n'a pas été observé de réponse nociceptive suite à l'application d'acétone. En outre, cette méthode consistant à appliquer le stimulus à un endroit localisé

ne provoquerait pas de stress thermique. Cette méthode développée chez le rat semble ainsi rendre compte de l'allodynie au froid. La possibilité d'utiliser des animaux transgéniques combinée avec la découverte récente de récepteurs cellulaires au froid a augmenté la pertinence de tester l'allodynie au froid avec précision chez la souris (McKemy *et al.* 2002; Peier *et al.* 2002). Ainsi, la mesure de l'allodynie au froid chez la souris a été réalisée à l'aide de la technique de l'acétone. Mais comme mentionné précédemment, ce qui fonctionne chez le rat ne fonctionne pas forcément de la même manière chez la souris. Ainsi, bien que l'application d'acétone reflète certainement une hypersensibilité au froid, chez des animaux neuropathiques par exemple, les animaux témoins (même naïfs), montrent une réponse nociceptive basale à l'application d'acétone (Smith *et al.* 2004, b; Lee *et al.* 2005). Nous voyons ainsi que les mesures d'hypersensibilité au froid sont effectuées principalement par une plaque froide à 4-5°C ou par la technique d'application d'acétone. Si cette dernière reflète mieux l'allodynie au froid chez le rat, il réside cependant des problèmes d'interprétation chez la souris.

En outre, l'application d'acétone ou l'évaluation du comportement sur une plaque froide ne permet pas à l'animal d'échapper au stimulus désagréable, ce qui peut poser un problème éthique quant au confort de l'animal lors des tests. Une méthode dite de « préférence de place » permettrait d'évaluer la sensibilité au froid tout en augmentant le confort de l'animal, puisque cette méthode évalue la propension qu'a l'animal à aller dans un environnement par rapport à un autre. Dans le cas de la mesure de sensibilité au froid, il s'agirait d'un environnement froid par rapport à un environnement thermiquement neutre.

#### **2.5.5. Nerf saphène**

Parmi les modèles de douleur neuropathique autres que ceux ciblant le nerf sciatique, nous n'avons pas encore mentionné le nerf saphène. En réalité, seulement très peu d'études ont associé le nerf saphène à la douleur neuropathique. Cependant, dans les études d'autotomie menées par Patrick Wall et ses collaborateurs, le nerf saphène sectionné



a augmenté l'autotomie induite par une axotomie du nerf sciatique (Wall *et al.* 1979). Cette double axotomie est encore utilisée afin d'évaluer le phénomène d'autotomie dans la douleur neuropathique (Banos *et al.* 1994; Kingery *et al.* 1999; Wolf *et al.* 2006). Plusieurs études ont également montré une implication du nerf saphène dans les phénomènes de réinnervation collatérale suite à une lésion du nerf sciatique (Devor *et al.* 1979). De même, le nerf saphène est impliqué dans l'allodynie et l'hyperalgésie induite par une lésion du nerf sciatique (Kingery *et al.* 1993; Tal et Bennett 1994). Une étude électrophysiologique sur des rats ayant été préalablement traités par la vincristine montre qu'un certain pourcentage des fibres C du nerf saphène sont hypersensibles à une stimulation thermique ou mécanique (Tanner *et al.* 1998). Enfin, quelques études récentes ont montré plus directement le lien entre une lésion sur le nerf saphène et la douleur neuropathique. En effet, le névrome (masse enchevêtrée de prolongements axonaux) produit par l'axotomie du nerf saphène induit de l'activité spontanée dépendante des canaux sodiques  $\text{Nav}1.8$  (Roza *et al.* 2003). De même, l'application locale de lysolécithine (un agent démyélinisant) sur le nerf saphène entraîne de l'allodynie et des décharges spontanées (Wallace *et al.* 2003).

Un avantage expérimental et éthique est que le nerf saphène est accessible juste sous la peau au niveau de la face médiane de la cuisse. Un modèle sur le nerf saphène n'entraînerait donc pas de lésion musculaire contrairement aux modèles ciblant le nerf sciatique. En outre, une propriété importante du nerf saphène est qu'il est exclusivement sensitif. Au point de vue expérimental, un modèle de douleur neuropathique sur le nerf saphène permettrait en ne lésant pas de fibre motrice d'empêcher que la patte ne prenne une position recroquevillée. Ce simple fait permet en outre d'évaluer avec plus de précision l'hypersensibilité mécanique qui dépend grandement du poids que met l'animal sur chaque patte (Le Bars *et al.* 2001, b). En outre, il serait plus évident de mesurer et d'interpréter les réactions motrices de l'animal si celui-ci n'a pas de problème moteur suite à une lésion nerveuse. Par ailleurs, il est à noter qu'une rhizotomie ventrale (comportant des fibres motrices) au niveau L5 entraîne de l'hyperalgésie thermique (Obata *et al.* 2004; Obata *et al.* 2006). Ainsi, le fait d'étudier un nerf typiquement sensitif en comparaison avec les autres

modèles utilisant un nerf mixte (comme le nerf sciatique) ou de rhizotomie ventrale permettrait de connaître avec précision le rôle qu'auraient les fibres motrices dans la douleur neuropathique. Un autre avantage du nerf saphène est qu'il est utilisé dans une préparation électrophysiologique *ex vivo* : la préparation nerf-peau (Reeh 1986). Ce modèle permet d'étudier avec précision les fibres afférentes primaires ainsi que leurs champs de perception cutanés. Il serait alors possible d'étudier avec précision les champs de perception d'un nerf rendu neuropathique, ce qui n'a jamais été réalisé jusqu'à présent.

Enfin, comme nous l'avons mentionné, en clinique la douleur neuropathique n'est pas une entité unique mais peut être le résultat de diverses causes. Le développement de modèles tels que ceux de neuropathie diabétique, de neuropathie induite par des agents de chimiothérapie, des agents démyélinisant etc., nous montre qu'il existe un besoin dans la variation des modèles neuropathiques. C'est cette pluralité de modèles qui permettra de mieux comprendre le syndrome de douleur neuropathique.

### 3. Hypothèses de recherche

Dans le but de mieux comprendre le phénomène de la douleur neuropathique, nous nous proposons de développer un nouveau modèle de douleur neuropathique périphérique par lésion nerveuse mécanique chez le rat et la souris. Pour cela, plusieurs points d'étude seront à effectuer :

- Afin de déterminer la faisabilité d'un tel modèle sur un nerf exclusivement sensitif nous devons étudier si une lésion du nerf saphène entraîne l'apparition d'allodynie (mécanique et au froid) et d'hyperalgésie (mécanique et thermique) au cours du temps après la procédure chirurgicale chez le rat et la souris.

- Comme nous l'avons mentionné, on ne dispose pas de technique convenable de mesure de l'allodynie au froid chez la souris. Afin d'éviter les problèmes d'interprétations inhérents aux techniques actuelles, nous proposons d'étudier le comportement des souris neuropathiques face au froid dans un paradigme de préférence de place. Cette technique nécessite un haut niveau d'intégration du système nerveux central étant, plus proche de l'évaluation de la douleur clinique. Il ne s'agirait alors plus « simplement » de mesure de réflexe nociceptif.
- Dans le but de savoir si le modèle de douleur neuropathique sur le nerf saphène peut se comparer à ce qui est rencontré en clinique et dans les autres modèles animaux, une validation pharmacologique sera effectuée à l'aide de différentes classes de médicaments utilisés contre la douleur neuropathique (morphine, gabapentine, amitriptyline et cannabinoïdes).
- Afin de vérifier que le modèle de douleur neuropathique du nerf saphène est applicable à la technique électrophysiologique nerf saphène-peau, nous allons observer les changements électrophysiologiques (modification de l'innervation et décharges ectopiques éventuelles) que la lésion du nerf saphène engendre.
- Enfin, peu d'études ont été effectuées sur l'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> dans le cas de douleur neuropathique, notamment en périphérie. Étant donné l'importance du système cannabinoïde, nous voulons étudier son implication dans ce modèle en évaluant l'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> au cours du temps à divers endroits clés de la transmission nociceptive que sont le territoire cutané, le ganglion rachidien et la moelle épinière. Une évaluation du système opioïde sera également effectuée par l'étude de l'expression du récepteur MOR.



## Articles

## Article n°1

Titre: “Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain.”

Auteurs : Jean-Sébastien Walczak<sup>1</sup>, Vincent Pichette<sup>1,2</sup>, François Leblond<sup>2</sup>, Karine Desbiens<sup>2</sup> and Pierre Beaulieu<sup>1,3</sup>

Département de Pharmacologie<sup>1</sup> - Université de Montréal, Département de Néphrologie, Centre de Recherche Guy Bernier Research<sup>2</sup> - Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Département d'Anesthésiologie<sup>3</sup> - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Revue : *Neuroscience*, année : 2005, numéro : 132, pages : 1093-1102.

Title:

**Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain.**

Authors:

Jean-Sébastien Walczak<sup>1</sup>, Vincent Pichette<sup>1,2</sup>, François Leblond<sup>2</sup>, Karine Desbiens<sup>2</sup> and Pierre Beaulieu<sup>1,3\*</sup>

Department of Pharmacology<sup>1</sup> - Université de Montréal, Department of Nephrology, Guy Bernier Research Center<sup>2</sup> - Maisonneuve-Rosemont Hospital, Department of Anesthesiology<sup>3</sup> - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

\*Corresponding author: Université de Montréal, Faculty of Medicine, Department of pharmacology. C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7  
Telephone: (514) 343-6338

Fax: (514) 343-2291

E-mail address: [REDACTED]

Section Editor: Dr D.L. Hammond, Department of Anesthesia, The University of Iowa, 200 Hawkins Drive 6JCP, Iowa City, IA 52242, USA.

**Abstract**

The saphenous partial ligation (SPL) model is a new, easily performed, rodent model of neuropathic pain that consists of a unilateral partial injury to the saphenous nerve. The present study describes behavioral, pharmacological and molecular properties of this model. Starting between three to five days after surgery, depending on the modality tested, animals developed clear behaviors indicative of neuropathic pain such as cold and mechanical allodynia, and thermal and mechanical hyperalgesia compared to naive and sham animals. These pain behaviors were still present at one month. Signs of allodynia also extended to the sciatic nerve territory. No evidence of autotomy or bodyweight loss was observed. Cold and mechanical allodynia but not thermal and mechanical hyperalgesia were reversed by morphine (4 mg/kg i.p.). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 (5 mg/kg i.p.) improved signs of allodynia and hyperalgesia tested except for mechanical hyperalgesia. Gabapentin (50 mg/kg i.p.) was effective against cold and mechanical allodynia but not hyperalgesia. Finally, amitriptyline (10 mg/kg i.p.) failed to reverse allodynia and hyperalgesia and its administration even led to hyperesthesia. Neurobiological studies looking at the expression of  $\mu$  opioid receptor (MOR), cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors showed a significant increase for all three receptors in ipsilateral paw skin, L3-L4 dorsal root ganglia and spinal cord of neuropathic rats compared to naive and sham animals. These changes in MOR, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor expression are compatible with what is observed in other neuropathic pain models and may explain the analgesia produced by morphine and WIN 55,212-2 administrations. In conclusion, we have shown that the SPL is an adequate model that will provide a new tool for clarifying peripheral mechanisms of neuropathic pain in an exclusive sensory nerve.

**Key words:** Neuropathic pain, allodynia, animal models, saphenous nerve, mu opioid receptors, cannabinoid receptors.

## Introduction

Diseases or trauma affecting peripheral nerves often induce the development of neuropathic pain, which is characterized clinically by hyperalgesia and allodynia. In recent decades, animal models have been developed in order to have a better understanding of the pathophysiology of neuropathic pain and to test new drugs. Many models of physical nerve injury are targeted at the sciatic nerve. They impart a partial injury of the nerve using different techniques such as chronic constriction injury (CCI, Bennett and Xie, 1988), partial sciatic nerve ligation (PSL, Seltzer et al., 1990), spinal nerve ligation (SNL, Kim and Chung, 1992), spared nerve injury (SNI, Decosterd and Woolf, 2000) and tibial nerve injury (Hofmann et al., 2003). Despite the advances that these models have brought us in terms of understanding the mechanisms of neuropathic pain, many questions remain unanswered.

In order to approach the complex pathophysiology of neuropathic pain from a different angle, we decided to develop a neuropathic pain model based on the saphenous nerve. One of the first experiments showing an implication of the saphenous nerve in neuropathic pain was described by P. Wall et al. (1979). The authors showed that a complete ligation of the saphenous nerve increased autotomy (a sign of *anesthesia dolorosa*) induced by ligation of the sciatic nerve. Later, the participation of the saphenous nerve in mechanical allodynia in the medial territory of the paw, following a CCI, was demonstrated (Tal and Bennett, 1994). In that case, transection of the saphenous nerve was used as a complementary explanation for the phenomenon that occurred on the sciatic nerve.

We have also developed a new model of neuropathic pain by partial ligation of the saphenous nerve for the following reasons: First, this model is less traumatic for the animal and easier to perform because of the superficial localization of the saphenous nerve on the anterior part of the thigh. In addition, this model is performed on an exclusively sensory nerve so that it is possible to discern any effect on motor fibers, as observed with the sciatic nerve which is a mixed one. Finally, this new model is an ideal one to use in the well-



known skin-nerve preparation (Reeh, 1986) for gaining a better understanding of the peripheral mechanisms of neuropathic pain.

We describe the development of the neuropathy after saphenous nerve partial ligation (SPL). To better characterize this new model, we studied the effects of standard analgesic drugs used in the treatment of neuropathic pain such as morphine (opioid agonist), WIN 55, 212-2 (cannabinoid agonist, only used in animal studies), and the adjuvant drugs gabapentin and amitriptyline. In addition to behavioral and pharmacological experiments, Western blot analysis were performed to evaluate if changes in the expression of the  $\mu$  opioid receptor (MOR) and of the cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors occurred at the paw skin innervated by the saphenous nerve, at the L3-L4 dorsal root ganglia (DRG) and at the spinal cord.

### **Experimental procedures**

All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and we received authorization from the animal ethics committee of the Université de Montréal. The animals were housed two per cage with a bedding of wood sawdust (8 - 16 mm) (Pro Chip, Canada) and maintained on 12 hours dark-light cycle with free access to food (18.0% protein, 4.5% fat, 5.5% fiber, 7.0% ash, 2.5% added minerals) (Charles River, Canada) and water. During periods of testing, rats were brought to the testing room one day before testing and there, they were kept on natural daylight. Thirty six male Wistar rats (175-200 g) were used to assess the development of the neuropathy and were dispatched in either SPL, sham or naive groups of 12 animals each. Eighty-four rats were used to test standard pharmacological compounds and 24 were used for Western blot analysis. During sensory testing, animals were placed in elevated Plexiglas boxes (21 x 17 x 14 cm) with a 0.7 cm diameter mesh floor, except for thermal hyperalgesia testing where the boxes had a dry glass floor. In testing boxes, rats were allowed to acclimatize for 15 min or until exploratory behavior ceased. On a given day, the sequence of behavioral testing for each animal was: cold allodynia (acetone), mechanical allodynia (von Frey hairs), mechanical

hyperalgesia (pin prick) and thermal hyperalgesia (plantar test). The rationale was that the sequence of testing should start with the least stressful tests and finish with the most disturbing ones, in order to minimize the influence of one test on other ones. Therefore, mechanical and thermal hyperalgesia testing were performed last. Acetone, von Frey hairs and pin prick techniques are performed on a mesh floor, so the plantar test was performed last because it minimized handling, thus stress (one change of environment instead of two). The time to complete one battery of tests was approximately 45 min.

### ***Surgery***

Under gaseous anesthesia with isoflurane (1-2%) in oxygen, a small incision (6-7 mm) was made on the anterior surface of the right thigh at a distance of one cm medial to the anterior superior iliac spine, the skin incision being transversal to the saphenous nerve. At that point, the saphenous vein is easily identified through the skin of a shaved animal, running parallel and medial to the nerve. The nerve was gently exposed under microscope magnification (20x). In the operated group, 30-50% of the nerve was trapped in a tight ligature made with an 8.0 Nylon suture, whereas in the sham-operated group, the nerve was left intact. For the two groups, the wound was closed with two skin staples.

### ***Sensory testing***

#### ***Cold allodynia***

Cold allodynia was assessed using the acetone drop application technique (Choi et al., 1994). Briefly, a drop of acetone was gently applied on the medial part of the plantar surface of the paw from the tip of a one mL syringe without touching the skin. The acetone quickly spreads over the plantar face and the medial hairy skin innervated by the saphenous nerve. A response was considered positive if the animal withdrew his paw following application. The acetone was applied five times with 1-2 min between each test and a percentage of positive responses was calculated.

*Mechanical allodynia*

Mechanical allodynia was tested with von Frey hairs (Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). The medial plantar surface of the paw was stimulated with a series of von Frey filaments of ascending forces (with a range comprised between 0.63 and 235 mN). For each filament, the stimulus was repeated five times with an interval of 1-2 s between each stimulation. The threshold was determined as the lower force that evoked a withdrawal response to one of the five stimuli (Tal and Bennett, 1994).

*Mechanical hyperalgesia*

Mechanical hyperalgesia was evaluated using a safety pin: the medial plantar surface of the hind paw was briefly stimulated at an intensity sufficient to indent but not to penetrate the skin. The duration of paw withdrawal was recorded: a brief normal response was considered to be 0.5 s and the maximum time recording was arbitrarily stopped at 10 s. Each result is expressed as the mean of three measurements. Intervals between tests were of at least three minutes (Decosterd and Woolf, 2000).

*Thermal hyperalgesia*

Thermal hyperalgesia was assessed using an infrared noxious heat stimulus (Plantar test, Ugo Basile, Italy). The center of a focused beam of radiant heat was applied to the medial plantar surface of the hind paw and the withdrawal latency time recorded. Results of each test are expressed as the mean of three withdrawal latencies (s). Three minutes was allowed between each test (Hargreaves et al., 1988).

### ***Development of the neuropathy***

The time-course of expression of the neuropathy was assessed by testing animals three days prior and every two days after the surgery during two weeks, then every week until one month postsurgery. Each test was made on both the operated and the contralateral hind paws.

### ***Effects of saphenous partial ligation on sciatic nerve territory***

After having evaluated baseline sensory threshold of 20 rats on the lateral plantar face of the paw (sciatic nerve territory), 10 of them had a SPL and 10 remained sham rats. Two weeks after surgery, mechanical allodynia and hyperalgesia were assessed in each group.

### ***Pharmacological interventions***

Sensory thresholds were assessed preoperatively and 14 days postoperatively. The day after, standard drugs were tested to characterize the model. Animals were randomized into five groups and received either morphine (4.0 mg/kg i.p.) (Hofmann et al., 2003) in 0.9% saline solvent, a synthetic cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> agonist (WIN 55,212-2) (5.0 mg/kg i.p.) in 0.9% saline + 40% dimethylsulfoxide (DMSO) solvent (Bridges et al., 2001), gabapentin (50 mg/kg i.p.) (Abdi et al., 1998; Hofmann et al., 2003; De Vry et al., 2004) and amitriptyline (10 mg/kg i.p.) (Idänpään-Heikkilä and Guilbaud, 1999; Esser and Sawynok, 1999) both in 0.9% saline. The fifth group only received 0.9% saline + 40% DMSO solvent as a control. Each drug was administered 45 min before testing in a volume of 2 mL/kg. The experimenter was blinded to the drug administered. In order to test if intraperitoneal injection would change pain behavior, 12 of the SPL and six of the naive rats received an injection of 0.9% saline (2 mL/kg) and were used as control for the following experiments. Indeed, in order to evaluate if any of the drugs injected had an effect *per se*, 24 naive rats were divided into four groups of six animals and received either morphine, WIN 55,212-2, gabapentin or amitriptyline in the same solvents and at the same concentrations as SPL animals. Naive animals followed the same testing protocol as SPL

rats with first baseline testing, then two weeks later, an assessment following no injection, vehicle or pharmacological compounds. Therefore, time- and age-matched rats could be compared to SPL animals.

### ***Drugs***

Morphine was provided by the CHUM pharmacy (Montréal, Québec), WIN 55,212-2 was purchased from Tocris Cookson Inc. (UK), and gabapentin and amitriptyline were supplied by Sigma-Aldrich (Canada).

### ***Receptor expression***

#### ***Tissue sampling***

Fourteen days after surgery, animals (naive, sham and SPL,  $n = 6$  per group) were euthanized with inhaled CO<sub>2</sub> and the ipsilateral foot hairy skins, L3-L4 DRG and total L3-L4 spinal cords were removed and snap frozen in liquid nitrogen. Furthermore, L3-L4 spinal cord samples (from SPL animals,  $n = 6$ ) were divided between ipsi and contralateral sides (by using the posterior median sulcus of the spinal cord as a guide for sagittal section) in order to assess if receptor expression would be different between each side.

#### ***Preparation of membrane fraction***

Tissues of each individual rat were treated separately. Membrane fraction was prepared to enrich the receptors being studied and facilitate their detection. This was done according to a modification of the procedure described by Nagahama et al. (2003). Frozen tissue samples were homogenized in ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 250 mM Sucrose and 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) with a polytron. The homogenate was centrifuged at 120 g for 10 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 100,000 g for 60 min at 4°C. The pellet containing the enriched membrane fraction was resuspended in 0.9% NaCl containing 1% SDS and 1 mM PMSF and stored at -80°C until analysis.

### *Western blot analysis*

The protein concentrations in samples were determined using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Bovine serum albumin was used as reference protein. Samples (spinal cord and skin 50 µg; DRG 25 µg) were electrophoretically separated on 9% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. Receptors (CB<sub>1</sub>, MOR and CB<sub>2</sub>) were evaluated using polyclonal goat anti-human CB<sub>1</sub> (1/100), rabbit anti-human MOR (1/200) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and rabbit anti-human CB<sub>2</sub> (1/2000) from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), respectively. Primary antibodies were incubated with blot overnight at 4°C. Immune complexes were revealed by secondary antibody (swine anti-goat IgG from Biosource International and Goat anti-rabbit IgG from Sigma (Oakville, ON, Canada), coupled to peroxidase and the Luminol derivative of Lumi-Light plus Western blotting substrate (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Immune reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry on exposed Biomax MR film.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a constitutively expressed protein, was also measured by Western blot using a polyclonal rabbit anti-human GAPDH (1/1000) from ABCAM (Cambridge, MA) as a gel loading control.

Results are reported as a ratio of receptor on GAPDH expression. The reported values are percentages of the mean value obtained for the control samples. Each blot was done in duplicate.

Specificity of the antibodies was established by immuno-neutralization of the antibody solution with specific synthetic peptide obtained from the manufacturers of the antibodies. By using 10 times excess of peptide, it was possible to determine that the major band observed in the control (non-neutralized) sample disappeared on the test blot. This band had a molecular weight of 58 kDa for the CB<sub>1</sub>, 45 kDa for the CB<sub>2</sub> and 47 kDa for the MOR. GAPDH was detected at 35 kDa.

### ***Statistical analysis***

Statistical significance was determined for time-course of the neuropathy by one-way ANOVA with Dunn's method for multiple comparisons between ipsilateral values for naive, sham and SPL rats. Confirmation of allodynia and hyperalgesia for SPL rats that underwent drug treatment was made by *t*-tests. Drug effects were determined by one-way ANOVA with Dunn's method for multiple comparisons versus control group. ANOVA on ranks were performed when non parametric data were evaluated. Effect of SPL on the sciatic nerve territory was evaluated with *t*-tests. Western blot results were compared by one-way ANOVA with Dunnett post hoc tests for multiple comparisons versus naive animal tissues. Significant difference between ipsi and contralateral values were compared using *t*-test (SigmaStat v2.03, Jandel Corporation, USA).  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### ***Development of the neuropathy***

#### ***General observations***

After surgery, no sign of autotomy or bodyweight loss was observed. The toes were not ventroflexed as is often seen with the sciatic nerve models. No motor impairment was observed following partial ligation of the saphenous nerve.

Sham and naive animals (control groups) behaved in the same way on the ipsi and contralateral sides; there was no significant difference in each modality tested throughout the period of testing.

#### ***Cold allodynia***

From the fifth day postsurgery to the end of the observation period, operated animals showed a significant increase in sensitivity to acetone application on the ipsilateral SPL paw, compared to both sham and naive rats (Fig. 1A). On the contralateral side, no difference was observed between SPL, sham and naive animals.

### *Mechanical allodynia*

Compared to sham and naive animals, a significant decrease of approximately 70% in the mechanical threshold on the saphenous territory was observed three days after surgery on the ipsilateral side of SPL animals and remained so during one month (Fig. 1B). On the contralateral side of SPL rats, some points around two weeks postsurgery were significantly different from either the sham or the naive values, but not different from both of them.

### *Mechanical hyperalgesia*

Saphenous partial ligation animals displayed significantly increased response to pin prick stimulation but not constantly, with significant responses being observed between five and 11 days and at three and four weeks postsurgery. The contralateral side in the three groups displayed no response throughout the period of testing (Fig. 1C).

### *Thermal hyperalgesia*

After surgery, SPL rats showed significantly decreased withdrawal latency of 4-5 s on the ipsilateral paw compared to the sham and naive rats from nine days postsurgery until the end of the experiments. On the contrary, withdrawal latencies were not significantly different on the contralateral side (Fig. 1D).

### *Contribution of the sciatic nerve*

We tested SPL animals for signs of mechanical allodynia and hyperalgesia in the sciatic nerve territory of the paw. Two weeks after surgery, SPL animals displayed significant lower mechanical threshold in the sciatic nerve territory when allodynia was tested. The ipsilateral paws were more sensitive to mechanical stimulation compared to sham animals. No significant difference was observed in the response to pin pricks in the sciatic nerve territory (Fig. 2A-B).



## ***Pharmacological interventions***

### *Control animals*

The study made on naive animals showed that the values of no injection and of 0.9% saline i.p. injection were the same; therefore, saline injection was taken as the control. Since no difference was observed between the six naive rats that received no injection and the six naive rats that received a saline control injection, we decided to pool these rats which are represented by the “naive” group on the left aspect of the right panel. Thus a group of 12 time-matched naive animals could be compared with the SPL control group of rats (Fig. 3).

Morphine, WIN 55,212-2 and gabapentin administration led to the same pattern of response as in control animals and thus did not induce hypoalgesia. On the contrary, amitriptyline injection increased sensitivity to acetone and decreased the mechanical threshold in a significant manner. Finally, amitriptyline had no significant effect on mechanical and thermal hyperalgesia in naive rats (Fig. 3, left panel).

Fourteen days after surgery, SPL animals clearly displayed signs of allodynia and hyperalgesia. As no difference was noted between 0.9% saline, 0.9% saline + 40% DMSO and no injection conditions (data not shown), 0.9% saline was taken as the control group.

### *Drug testing*

Morphine (4 mg/kg, i.p.) significantly reversed cold and mechanical allodynia (Fig 3A and B). However, the mean withdrawal response after pin prick was not significantly different from controls (Fig.3C) and thermal hyperalgesia was not reversed by morphine. (Fig 3D). WIN 55,212-2 (5 mg/kg, i.p.) significantly reduced cold sensitivity (Fig. 3A), mechanical allodynia (Fig. 3B) as well as thermal hyperalgesia (Fig. 3D) on the ipsilateral side but it was not significantly effective against mechanical hyperalgesia (Fig. 3C).

Gabapentin (50 mg/kg, i.p.) significantly alleviated cold and mechanical allodynia symptoms (Fig. 3A and B) but did not improve mechanical and thermal hyperalgesia (Fig. 3C and D).

Amitriptyline (10 mg/kg, i.p.) was unable to reverse cold or mechanical allodynia as well as mechanical and thermal hyperalgesia (Fig. 3A, B, C and D). Moreover, SPL animals treated with amitriptyline displayed significant mechanical allodynia on the contralateral side (Fig. 3B).

### ***Receptor expression***

#### ***Mu opioid receptor***

Mu opioid receptor expression was increased in the ipsilateral skin and DRG, and the L3-L4 spinal cord of neuropathic (SPL) animals compared to naive and sham rats (Fig. 4A). The largest increase of MOR was localized in the DRG (52% increase).

#### ***Cannabinoid receptors***

Western blot analysis revealed that both cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor expression was significantly increased in the ipsilateral skin and DRG, and L3-L4 spinal cord of SPL rats (Fig. 4B and C). For each receptor the largest increase of expression was located at the spinal cord (78% and 59% for cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, respectively). The expression of cannabinoid receptors did not differ between naive and sham rats.

#### ***Hemisectioned spinal cords***

The expression of MOR and cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors was significantly higher in the ipsilateral spinal cords than in contralateral ones (Fig 4D).

## Discussion

We have developed and characterized a new animal model of neuropathic pain targeted at the saphenous nerve. Saphenous nerve partial ligation produces typical symptoms of neuropathic pain such as allodynia and hyperalgesia. This model is easily and quickly performed and contrary to most sciatic nerve models, no muscle lesion is produced since the ligation is performed in the middle anterior part of the thigh, where the saphenous nerve is located just beneath the skin. Hence, this model corresponds to ethical guidelines from the International Association for the Study of Pain (IASP), which tend to minimize suffering of animals (Zimmermann, 1983). In addition, the saphenous nerve offers the opportunity for studying neuropathic pain on an exclusively sensory nerve. Despite the fact that this prevents motor impairment, such as ventroflexion of the foot observed with sciatic nerve models, our model confirms that the development of the neuropathy is possible without participation of motor fibers, which is consistent with a recent study of induction of neuropathic pain by demyelination (Wallace et al., 2003). In this study, a focal treatment of either the sciatic or the saphenous nerve by lysolecithin induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Finally, another advantage of the SPL compared to sciatic nerve models is that it can easily be used in the skin-nerve preparation (Reeh, 1986) to allow recordings of action potentials from single fibers of the saphenous nerve (above or below the injury) after stimulation of the receptor field on the paw skin.

### *Time-course of neuropathic pain*

Like other models, SPL induced signs of hypersensitivity very rapidly (from three to five days post surgery) and these lasted for at least one month. A characteristic of the SPL model is that it affected pain behavior in the four modalities tested. Indeed, it displayed clear signs of cold and mechanical allodynia as well as thermal hyperalgesia, whereas signs of mechanical hyperalgesia were not present constantly in a significant manner. This is in accordance with other neuropathic pain models where each modality is not present with the same magnitude. A comparison of CCI, PSL and SNL showed for example that SNL

produced stronger mechanical allodynia than CCI (Kim et al., 1997). In the same way, tibial nerve injury induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, but the latter was less robust than the former (Hofmann et al., 2003). The variability of the test may explain why mechanical hyperalgesia was not detected more often in SPL animals compared to sham and naive rats. This variability could be due to the test itself since a pin prick stimulus is very hard to reproduce with the same intensity or to a specific property of SPL. Indeed, a recent study comparing five different rat models of peripheral nerve injury on the sciatic nerve showed that the response to pin prick test remained relatively stable over time (Dowdall et al., 2005). Moreover, the responses obtained were of greater amplitude than the one we observed with the SPL model. These differences may be due to the fact that the saphenous nerve is exclusively a sensory one, but this remains speculative. The use of another method to assess mechanical hyperalgesia such as suprathreshold mechanical stimulus using von Frey hair (Fu et al., 2004) should be assessed in order to conclude definitively about SPL and the development of mechanical hyperalgesia.

SPL surgery induced some contralateral effects, especially when mechanical allodynia was tested, but these were of small magnitude using our method of comparison, which could not show any difference between SPL and both sham and naive contralateral values.

Extra-territorial pain is observed after SPL. Indeed, after surgery, animals displayed clear mechanical allodynia on the territory of the sciatic nerve on the ipsilateral side. Similarly, Tal and Bennett (1994) have shown that CCI induced mechanical allodynia and hyperalgesia on the territory of the saphenous nerve. Collateral sprouting is one of the possible explanations of extraterritorial pain behavior, but there is no evidence for abnormal sensitivity of collateral sprouts. Therefore, a phenomenon of central sensitization is also possible. Again, it is not clear which mechanism explains extraterritorial pain in our model, but the use of the skin-nerve preparation with our model could clarify some of these aspects.

### ***Pharmacological studies***

Pharmacological characterization of the model was done using specific drugs that have been shown to be active in neuropathic pain. The use of opioids in neuropathic pain is however controversial. Clinical and animal studies have either shown negative (Idänpään-Heikkilä and Guilbaud, 1999; Ohsawa et al., 2000) or positive (Scott et al., 2002; Rowbotham et al., 2003; Hofmann et al., 2003; Zhao et al., 2004) results. In the SPL model of neuropathic pain, animals given morphine only responded positively to cold and mechanical allodynia. Morphine half-life is about 115 min in rats (Iwamoto and Klaassen, 1977). A battery of tests lasted for approximately 45 min, so hyperalgesia testing was completed 90 min after morphine injection. Hence, a possible decrease in the effects of morphine at the time of thermal hyperalgesia testing could explain the lack of efficacy of morphine. Another explanation could be that following i.p. injection, morphine could undergo significant first-pass metabolism. Therefore, the dose of 4 mg/kg of morphine could be near the minimum effective dose against thermal hyperalgesia. However, the results we showed are in accordance with some other studies which showed that morphine is not always effective against heat pain (Ohsawa et al., 2000, Naef et al., 2003).

The cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, suppressed cold and mechanical allodynia as well as thermal hyperalgesia after SPL. Again as with morphine, mechanical hyperalgesia did not respond to WIN 55,212-2, but, as already mentioned, there is a large variability with this test. The results also indicate that WIN 55,212-2 did not induce hypoalgesia nor produced psychomotor effects since naive rats or even values from the contralateral side were not different from control animals. The efficacy of a cannabinoid agonist in neuropathic pain is consistent with the study of Bridges et al. (2001) which showed that mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were reversed by WIN 55,212-2 after SNL. Cannabinoids have also shown positive results in other neuropathic pain models such as CCI (Lim et al., 2003; Hama and Urban, 2004) and focal lysolecithin-induced demyelination (Wallace et al., 2003).

Gabapentin at a dose of 50 mg/kg i.p. improved symptoms of allodynia but not of hyperalgesia. Depending on the animal model used, gabapentin has shown different responses against neuropathic pain. It has been observed in the SNL model that mechanical allodynia was improved by gabapentin (50 mg/kg i.p.) (Abdi et al., 1998). In SNI, a higher dose (100 mg/kg i.p.) also alleviated mechanical allodynia but had no effect on cold allodynia or mechanical hyperalgesia (Erichsen and Blackburn-Munro, 2002). In the pharmacological characterization of the CCI model, De Vry et al. (2004) recently showed that gabapentin (50 and 100 mg/kg i.p.) was slightly effective against mechanical allodynia and that thermal hyperalgesia was partially alleviated with a dose of 50 mg/kg, but not with injection of 100 mg/kg. Finally, it has been observed in tibial nerve injury that gabapentin at doses of 50 and 100 mg/kg i.p. failed to improve mechanical allodynia (Hofmann et al., 2003).

In our model, amitriptyline was totally ineffective against neuropathic pain. Although regularly used in the clinic, amitriptyline, in animals, has shown different kind of responses depending on the modality tested and the model of neuropathy used. Amitriptyline is more often reported to alleviate thermal hyperalgesia: in SNL at a dose of 10 mg/kg i.p. (Esser and Sawynok, 1999), in CCI at a dose of 30 mg/kg i.p. (Bomholt et al., in press) and 32 or 128 mg/kg p.o (De Vry et al, 2004). Mechanical allodynia is rarely reported to be alleviated. Idänpään-Heikkilä and Guilbaud (1999) showed that mechanical allodynia associated with trigeminal neuropathic pain was not alleviated by amitriptyline. In CCI, no change in mechanical threshold was observed for doses of amitriptyline ranging from 3 to 30 mg/kg i.p. (Bomholt et al., in press) and from 32 to 128 mg/kg p.o. (De Vry et al., 2004). Hofmann et al. (2003) showed only a very weak attenuation of mechanical allodynia with a high dose (32 mg/kg i.p) of amitriptyline that certainly has sedative effects whereas a smaller dose (1.5 mg/kg i.p) increased the threshold of mechanical allodynia (Abdi et al., 1998). After SNL, no effect of amitriptyline was observed on mechanical allodynia and, moreover contralateral sides developed mechanical allodynia compared to control animals (Esser and Sawynok, 1999); these authors defined it as a hyperaesthetic response. We

observed the same phenomenon in SPL rats. Also, it is noticeable that in our study, even naive rats displayed more sensitivity to cold and mechanical stimuli, which indicates that this hyperaesthetic response is specific to amitriptyline alone and not due to the combination of this drug and surgery.

In summary, we have shown that SPL animals are sensitive to different families of analgesics. However, not all behavioral symptoms of neuropathic pain are alleviated by these drugs. In our model, the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 appears to be the most effective since it significantly prevented pain behavior in three of the four modalities tested. Nevertheless, we have only tested one dose of each drug using an acute administration paradigm. Therefore, other doses should be tried and it would be of great interest to test SPL animals after chronic administrations of these analgesics.

### ***MOR and cannabinoid receptors expression***

The effects of WIN 55,212-2 and morphine in reducing sensitivity thresholds could be explained by an increase in CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> and MOR receptor expression in the periphery, DRG and ipsilateral lumbar spinal cord. Cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors up regulation was observed in another study (Lim et al., 2003) using the CCI model. In this particular study, changes in CB<sub>1</sub> expression were only observed at the spinal level indicating that the increase would only be at a postsynaptic level. In the current SPL model, the increase of CB<sub>1</sub> receptors in the spinal cord but also in the DRG and the periphery indicates an increase of expression at the presynaptic level. The fact that the relative increase is more important in the spinal cord compared to other locations, allows us to suggest that a postsynaptic increase of cannabinoid receptors can also participate in this increase at the spinal level.

Specific activation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors has been able to inhibit neuropathic pain in animals (Ibrahim et al., 2003). However, although CB<sub>2</sub> receptors are not normally present in the central nervous system, little is known about the expression of CB<sub>2</sub> receptors outside the immune system. We found an increase of CB<sub>2</sub> receptors in the skin, DRG and

spinal cord but it is possible that in the latter case, microglial cells were responsible for this over expression of CB<sub>2</sub> receptors (Zhang et al., 2003).

The increase of MOR observed in neuropathic pain conditions is consistent with some but not all the studies already published. Indeed, immunohistochemical studies have shown different kinds of expression of the MOR in the ipsilateral dorsal horn: an increase after CCI (Truong et al., 2003), a decrease after PNL (Goff et al., 1998; Zhang et al., 1998) and little change and no change (Porreca et al., 1998; Wang et al., 2001; Briscini et al., 2002) after SNL.

### ***Conclusion***

The saphenous nerve partial ligation is a new animal model of neuropathic pain which is easy to perform and which causes less animal discomfort than models using the sciatic nerve. Neuropathic behavior such as allodynia and hyperalgesia is present from the third to the fifth days and up to one month following nerve ligation. Overall, neuropathic animals respond well to standard analgesic drugs except for amitriptyline, at the doses used in this study. Saphenous partial ligation increases the expression of MOR and cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors that are implicated in pain control at different parts along the primary afferent neuron (periphery, dorsal root ganglion and spinal cord). A major specificity of our model is that it is performed on an exclusively sensory nerve. Indeed, it is known that motor fibers can participate in neuropathic pain (Obata et al., 2004). Therefore, our model will allow the study of neuropathic pain without the participation of motor fibers and will determine the involvement of sensory fibers in this condition. Furthermore, this model may mimic a clinical situation encountered after surgery which could lead to sensory nerve injury. Finally, in combination with the skin-nerve preparation this model will offer a potent tool for studying peripheral mechanisms of neuropathic pain.

### ***Acknowledgments***

P.B. has received a start-up funding from the Research Center of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) and holds a grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).



## References

- Abdi S, Lee DH, Chung JM (1998) The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 87:1360-1366.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G (in press) Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology*.
- Bridges D, Ahmad K, Rice ASC (2001) The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 133:586-594.
- Brisicini L, Corradini L, Ongini E, Bertorelli R. (2002) Up-regulation of ORL-1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury. *Eur J Pharmacol* 447:59-65.
- Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59:369-376.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G (2004) Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 491:137-148.
- Dowdall T, Robinson I, Meert TF (2005) Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80:93-108.
- Erichsen HK, Blackburn-Munro G (2002) Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain* 98:151-161.
- Esser MJ, Sawynok J (1999) Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptoms and route effects. *Pain* 80:643-653.
- Fu W-M, Chang T-K, Sun W-Z, Ling Q-D, Peng H-C, Liou H-C, Lu D-Y, Huang T-F (2004) Inhibition of neuropathic pain by a potent disintegrin – triflavin. *Neurosci Lett* 368:263-268.
- Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L (1998) Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 82:559-574.

Hama AT, Urban MO (2004) Antihyperalgesic effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 is mediated through an interaction with spinal metabotropic glutamate-5 receptors in rats. *Neurosci Lett* 358:21-24.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.

Hofmann HA, De Vry J, Siegling A, Spreyer P, Denzer D (2003) Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 470:17-25.

Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP (2003) Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10529-10533.

Idänpään-Heikkilä JJ, Guilbaud G (1999) Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain* 79:281-290.

Iwamoto K, Klaassen CD (1977) First-pass effect of morphine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 200:236-244.

Kim SH, Chung JM. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-63.

Kim JK, Yoon YW, Chung JM (1997) Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113:200-206.

Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J (2003) Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of WIN55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain* 105:275-283.

Naef M, Curatolo M, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, Zbinden A, Brenneisen R (2003) The analgesic effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), morphine, and a THC-morphine combination in healthy subjects under experimental pain conditions. *Pain* 105:79-88.

Nagahama K, Yamato M, Kato S, Takeuchi K (2003) Protective effect of lafutidine, a novel H(2)-receptor antagonist, on reflux esophagitis in rats through capsaicin-sensitive afferent neurons. *J Pharmacol Sci* 93:55-61.

Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Yoshikawa H, Noguchi K (2004) Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp Neurol* 188:149-160.

Ohsawa M, Mizoguchi H, Narita M, Narita M, Kamei J, Nagase H, Tseng LF (2000) Effects of a  $\mu$ -opioid receptor agonist on G-protein activation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 401:55-58.

Porreca F, Tg QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J. (1998) Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. *Brain Res* 795: 197-203.

Reeh PW (1986) Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 66:141-146.

Rowbotham MC, Twilling L, Davies PS, Reisner L, Taylor K, Mohr D (2003) Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. *N Engl J Med* 348:1223-1232.

Scott DA, Wright CE, Angus JA (2002) Actions of intrathecal  $\omega$ -conotoxins CVID, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 451:279-286.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.

Tal M, Bennett GJ (1994) Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57:375-382.

Truong Z, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodone DW (2003)  $\mu$  opioid receptors and analgesia at the site of peripheral nerve injury. *Ann Neurol* 53:366-375.

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-113.

Wallace VCJ, Cottrel DF, Brophy PJ, Fleetwood-Walker SM (2003) Focal Lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain that is attenuated by cannabinoids. *J Neurosci* 23:3221-3233.

Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Brennan MB, Hochgeschwender U, Hruby VJ, Malan TP Jr, Lai J, Porreca F (2001) Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 21:1779-1786.

Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D (2003) Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 17:2750-2754.

Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Eldes R, Hökfelt T (1998) Down-regulation of  $\mu$  opioid receptors in rats and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 82:223-240.

Zhao C, Tall JM, Meyer RA, Raja SN (2004) Antiallodynic effects of systemic and intrathecal morphine in the spared nerve injury model of neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 100:905-911.

Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

Figure 1

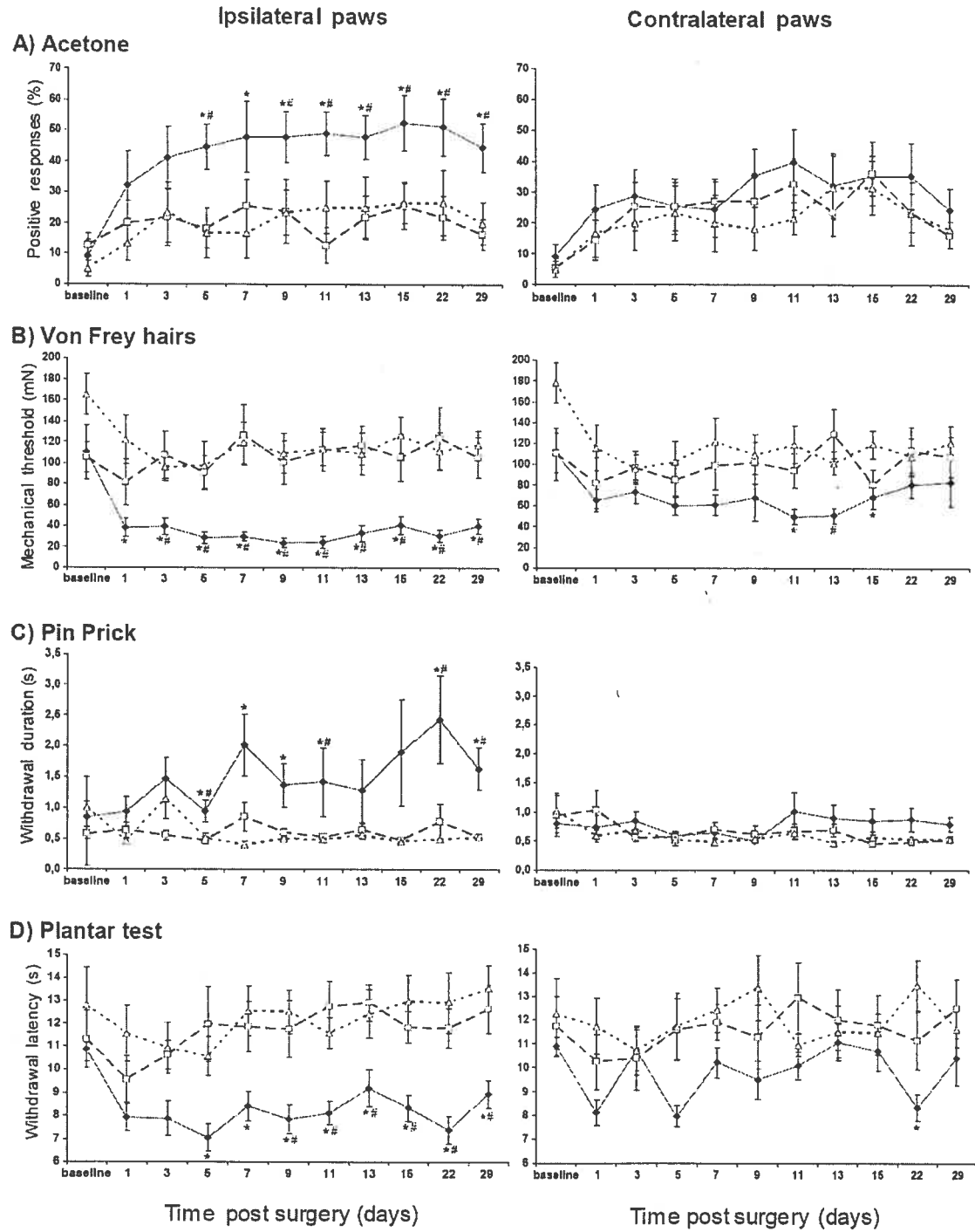


Figure 2

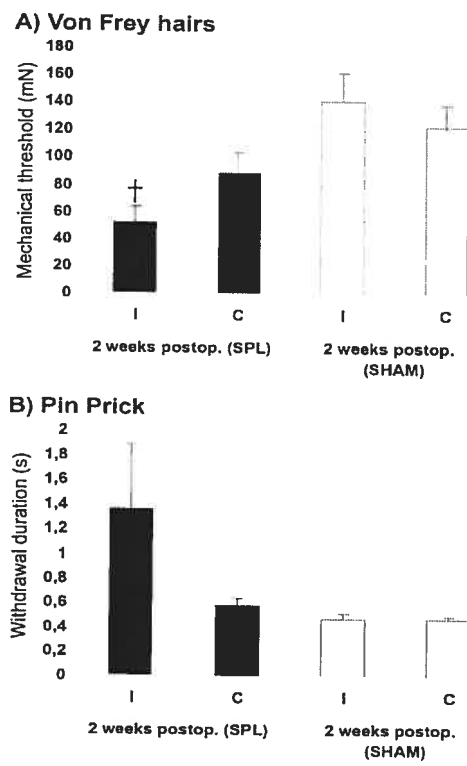


Figure 3

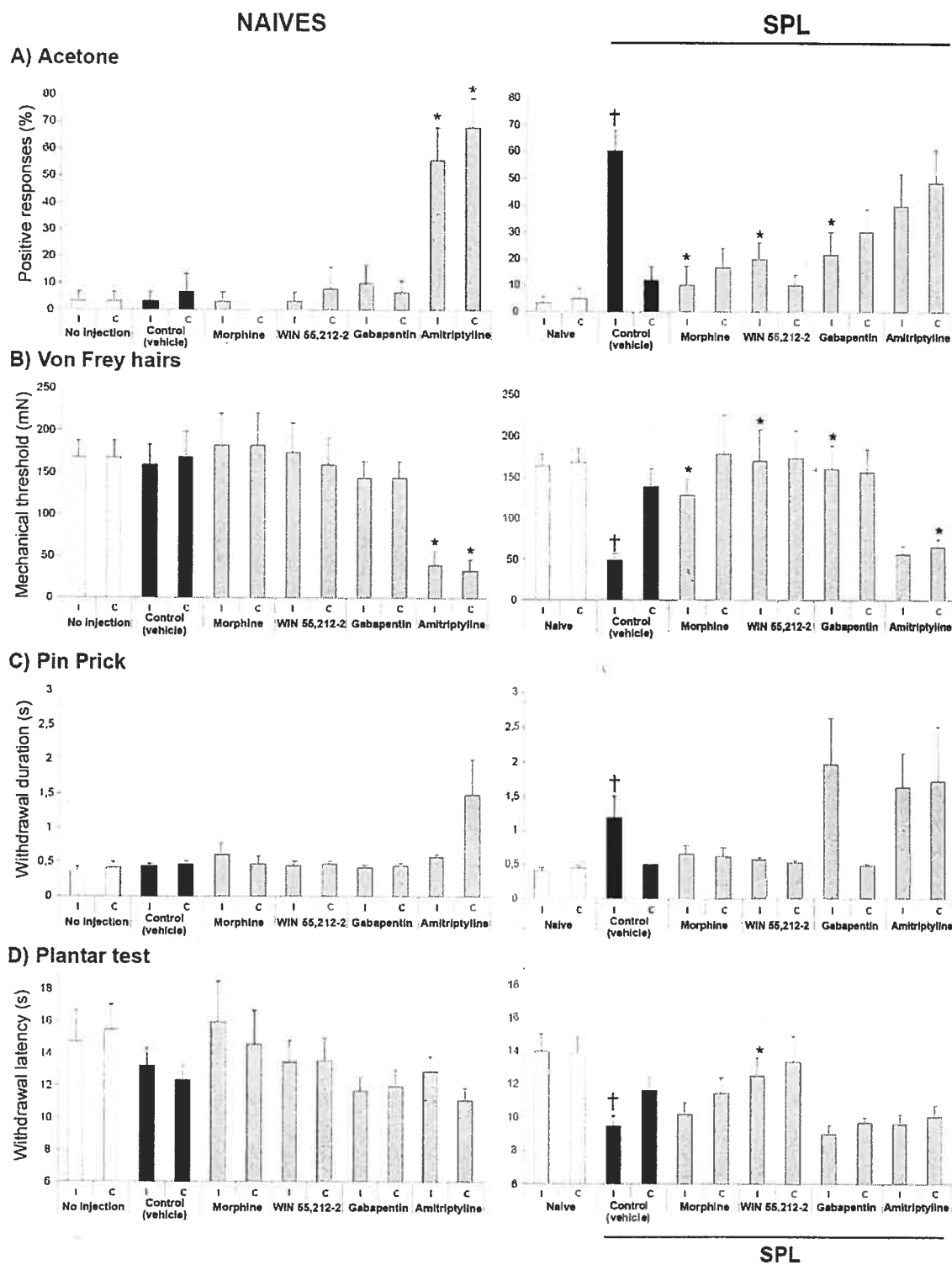
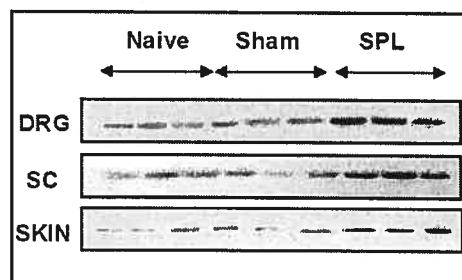
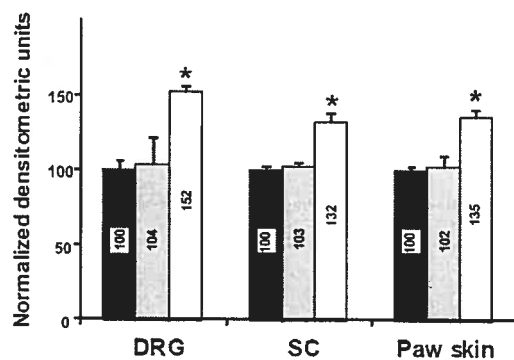
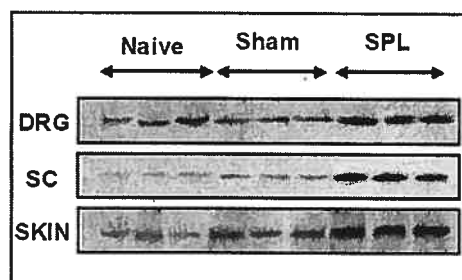
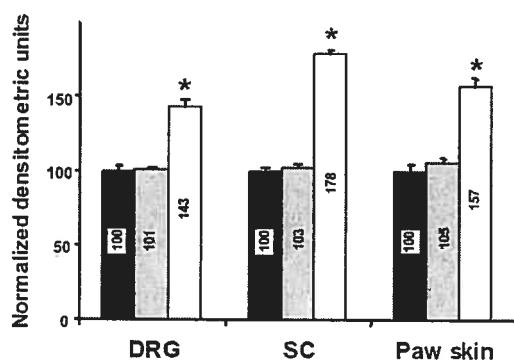
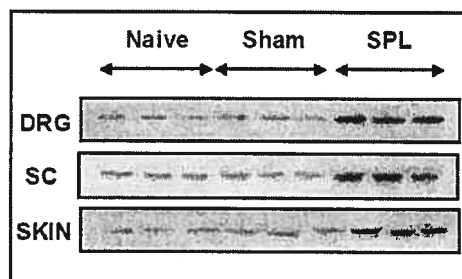
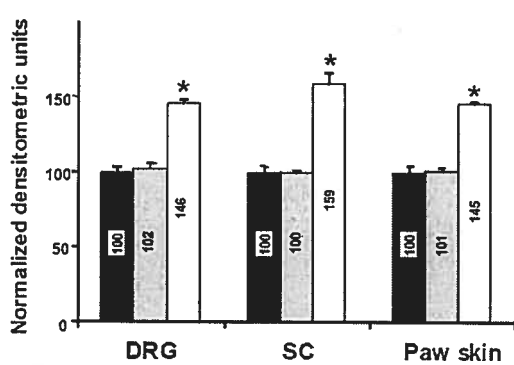
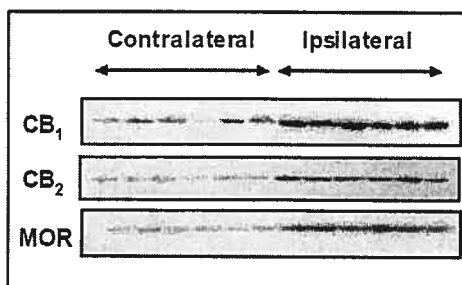
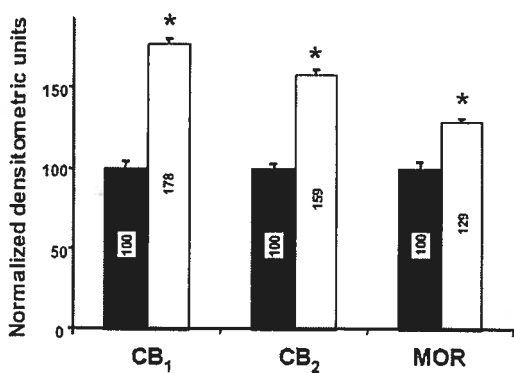


Figure 4

## A) MOR

B) CB<sub>1</sub>C) CB<sub>2</sub>

## D) Hemisectioned spinal cord





### Legends used with Figures

Fig. 1. Time course of sensitivity to acetone (A), von Frey hairs (B), pin prick (C) and Plantar test (D) in saphenous partial ligation (SPL) (n=12), sham (n=12) or naive (n=12) rats. Results are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  versus naive; #  $P < 0.05$  versus sham. Full diamonds: SPL, open squares: sham, open triangles: naive animals.

Fig. 2. Effects of SPL (n=10) and sham operations (n=10) on the territory of the sciatic nerve for sensitivity to von Frey hairs (A) and pin prick (B). Results are mean  $\pm$  SEM.  $t$ -test: †  $P < 0.05$  versus sham. (I = ipsilateral side, C = contralateral side)

Fig. 3. Effects of morphine, WIN 55, 212-2, gabapentin and amitriptyline on naive and SPL neuropathic rats. Left panel (n=6 per group): the effect of vehicle injection was determined using  $t$ -test (†) comparing time-matched no injection with vehicle injection; drug effects on naive rats were determined by one way ANOVA (\*). Right panel (n=12 per group): the assessment of the neuropathy was determined using  $t$ -test (†) comparing time-matched naive rats (the naive “no injection” group was pooled with naive “vehicle” group injection) with SPL control rats; drug effects were determined by one way ANOVA (\*). Results are mean  $\pm$  SEM. (†,  $P < 0.05$ ) (\*,  $P < 0.05$  versus control group). (I = ipsilateral side, C = contralateral side)

Fig. 4. Western blot analysis of  $\mu$  opioid receptor (MOR) (A), CB<sub>1</sub> (B) and CB<sub>2</sub> receptors (C) in ipsilateral skin and L3-L4 dorsal root ganglion (DRG), and spinal cord (SC) rat tissues. The reported values are percentages of the mean value (n = 6) obtained for the naive samples (black bars) and expressed for sham (grey bars) and saphenous partial ligation (SPL) (white bars) animals. \*  $P < 0.05$  versus naive group. Western blot analysis of the same receptors for the ipsi (white bars) and contralateral (black bars) spinal cords of SPL rats is shown in (D).

## Article n° 2

Titre: “Characterization of the chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes.”

Auteurs : Jean-Sébastien Walczak<sup>1</sup>, Vincent Pichette<sup>1,2</sup>, François Leblond<sup>2</sup>, Karine Desbiens<sup>2</sup> and Pierre Beaulieu<sup>1,3</sup>

Département de Pharmacologie<sup>1</sup> - Université de Montréal, Département de Néphrologie, Centre de Recherche Guy Bernier Research<sup>2</sup> - Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Département d'Anesthésiologie<sup>3</sup> - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Revue : *Journal of Neuroscience Research*, année : 2006, volume 83, pages : 1310-1322.

Title:

**Characterization of the chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes**

Authors:

Jean-Sébastien Walczak<sup>1</sup>, Vincent Pichette<sup>1,2</sup>, François Leblond<sup>2</sup>, Karine Desbiens<sup>2</sup> and Pierre Beaulieu<sup>1,3\*</sup>

(1) Department of Pharmacology - Université de Montréal, (2) Department of Nephrology - Guy Bernier Research Center - Maisonneuve-Rosemont Hospital, (3) Department of Anesthesiology - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Running title: Saphenous nerve murine model of neuropathic pain

\*Corresponding author: Université de Montréal, Faculty of Medicine, Department of pharmacology. C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Telephone: (514) 343-6338

Fax: (514) 343-2291

E-mail address: pierre.beaulieu@umontreal.ca

**Fundings:** P.B. has received start-up funding from the Research Centre of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) and holds grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Organon Canada Ltd. Canadian Research Award in Anesthesia.

**Abstract**

Neuropathic pain is one of the most inextricable problems encountered in clinics because few facts are known about its etiology. Nerve injury often leads to allodynia and hyperalgesia which are symptoms of neuropathic pain. The aim of this study was to understand some molecular and electrophysiological mechanisms of neuropathic pain after chronic constriction of the saphenous nerve (CCS) in mice. After surgery, CCS mice displayed significant allodynia and hyperalgesia, which were sensitive to acute systemic injection of morphine (4 mg/kg), gabapentin (50 mg/kg), amitriptyline (10 mg/kg) and to the cannabinoid agonist WIN 55, 212-2 (5 mg/kg). These behavioral changes were accompanied after surgery by an increase of c-Fos expression and by an over expression of  $\mu$  opioid and cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in the spinal cord and the dorsal hind paw skin. In combination with the skin-nerve preparation, this model showed a decrease in functional receptive fields downstream to the injury and the apparition of A-fiber ectopic discharges. In conclusion, CCS injury induced behavioral, molecular and electrophysiological rearrangements that may help to better understand peripheral mechanisms of neuropathic pain. This model takes advantage of the possible use of genetically modified mice and of an exclusively sensory nerve for a comprehensive study of peripheral mechanisms of neuropathic pain in the future.

**Key words:** Neuropathic pain, murine models, sensory nerve, mu opioid receptors, cannabinoid receptors, skin-nerve preparation.

## Introduction

Because they can be bred easily, mice are very useful laboratory animals. Twenty years ago, the possibility of mutating specific genes provided the scientific community with a potent tool for studying physiological mechanisms in mammals. The study of pain was no exception and many mutant mice with specific pain phenotypes have been developed. In combination with other techniques, these animals can clarify specific mechanisms of pain, in particular neuropathic pain which is a multifactorial phenomenon (Malmberg and Zeitz, 2004).

Although many variants of neuropathic pain models have been developed for the sciatic nerve, little is known about neuropathic pain models targeting the saphenous nerve, despite the fact that the saphenous nerve offers potential advantages that would help to better understand the complex etiology of neuropathic pain. Indeed, the saphenous nerve, as the sciatic nerve, innervates the hind limb, allowing easy behavioural testing. In addition, this nerve is exclusively a sensory nerve, revealing a potential interest to study neuropathic pain without the participation of motor fiber. In addition, the fact that no motor impairment occurs, since no motor fibres are injured, adds precision about behavioural testing interpretation. Another advantage of targeting the saphenous nerve is that it is used in the well-known skin-nerve preparation, an electrophysiological model which comprises the saphenous nerve and a patch of innervated skin of the hind paw (Reeh, 1986). It allows for the study of receptive fields and testing of the effects of drugs on peripheral injured fibers, both of which contribute to the understanding of peripheral mechanisms of neuropathic pain. Injury to the saphenous nerve has already been recently reported in mice and led to spontaneous activity after a complete transection of the nerve (Roza et al., 2003) or focal demyelination by lysolecithin (Wallace et al., 2003). Also, in rats, we have already developed a new model of neuropathic pain by partial ligation of the saphenous nerve (Walczak et al., 2005). Nevertheless, interspecies variability could be present and does not allow us to generalize for mice conclusions obtained with rats (Le Bars et al., 2001).

In the present study, we wanted to evaluate the effects of another type of injury to the saphenous nerve in mice: the chronic constriction model, which is one of the most used surgery targeting the sciatic nerve (Bennett and Xie, 1988). After having developed and characterized this model of neuropathic pain in mice by chronic constriction of the saphenous nerve (CCS), some aspects of the etiology of neuropathic pain were evaluated by looking at time-dependent molecular and electrophysiological rearrangements.

### **Materials and methods**

All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and we received authorization from the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal. The animals were housed four per cage with a bedding of wood sawdust (8 - 16 mm) (Pro Chip, Canada) and maintained on a 12-h dark-light cycle with free access to food (18.0% protein, 4.5% fat, 5.5% fiber, 7.0% ash, 2.5% added minerals) (Charles River, Canada) and water. During periods of testing, mice were brought to the testing room one day before testing and kept under natural daylight. Thirty-six male C57BL/6 mice (20-25 g at the beginning of the experiment) were used to assess the development of the neuropathy and were placed in CCS, sham or naive groups of 12 animals each. Seventy-two mice were used to test standard pharmacological compounds, 144 were used for Western blot analysis (sham, naive, CCS at one and seven days post surgery,  $n=36$  per group), 16 for *c-fos* immunoreactivity assays (CCS animals at one and seven days post surgery with corresponding sham mice,  $n=4$  per group) and 24 for electrophysiological recordings (naive, CCS at one and ten days post surgery,  $n=8$  per group).

### ***Surgery***

Under gaseous anesthesia with isoflurane (1-2%) in oxygen, a small incision (5-6 mm) was made on the anterior surface of the right thigh at a distance of 8-9 mm medial to the anterior superior iliac spine, the skin incision being transversal to the saphenous nerve. At that point, the saphenous vein is easily identified through the skin of a shaved animal,

running parallel and medial to the nerve. The nerve was gently exposed under microscopic magnification (35x). In the operated group, three loose ligatures, spaced at 1-2 mm, made with an 8-0 nylon suture (Dermalon, Sherwood Medical, St Louis, USA) around the nerve circumference were performed, whereas in the sham-operated group, the nerve was left intact. For both groups, the wound was closed with two 6-0 silk sutures (Ethicon, Johnson & Johnson, Ontario, Canada).

### *Sensory testing*

During sensory testing, animals were placed in elevated Plexiglas boxes (10.5 x 8.5 x 14 cm) with a 0.7 cm diameter mesh floor, except for thermal hyperalgesia testing where the boxes had a dry glass floor. In testing boxes, mice were allowed to acclimatize for 20 min or until exploratory behavior ceased. On a given day, the sequence of behavioral testing for each animal was: cold allodynia (acetone), mechanical allodynia (von Frey hairs), mechanical hyperalgesia (supra threshold von Frey hairs) and thermal hyperalgesia (Plantar test). Animals had five minutes of rest between each different test except for the Plantar test where they reacclimatized for another 20 min due to the change of floor.

### *Cold allodynia*

Cold allodynia was determined by gently placing 25  $\mu$ L of acetone with a micropipette on the plantar surface of the hind paws. The time the animal spent licking or shaking the stimulated paw was recorded during one minute. Three measurements were done and averaged for each paw with at least three minutes between each stimulation (Smith et al., 2004).

### *Mechanical allodynia*

The medial plantar surface of the paw was stimulated with a series of von Frey filaments of ascending forces (with a range comprised between 0.06 and 2.3 g). For each filament the

stimulus was repeated five times. The threshold was determined as the lower force that evoked a withdrawal response to one of the five stimuli (Tal and Bennett, 1994).

#### *Mechanical hyperalgesia*

A supra threshold ( $\approx 2$  g) von Frey hair was applied 10 times, every three seconds, to the plantar surface of the hind paws. The results were expressed as a percentage of foot withdrawal (Fu et al., 2004).

#### *Thermal hyperalgesia*

Thermal hyperalgesia was assessed using an infrared noxious heat stimulus (Plantar test, Ugo Basile, Italy). The center of a focused beam of radiant heat was applied to the plantar surface of the hind paw and the withdrawal latency time recorded. Results of each test are expressed as the mean of three withdrawal latencies (s). The maximum heat stimulus latency of the device was 32 s. Three minutes were allowed between each test (Hargreaves et al., 1988).

#### *Development of the neuropathy*

Basal sensitivity thresholds were assessed on the ipsi- and contralateral paws one day before surgery. The day following surgery the animals were tested, then every two days during one week and finally every week until one month post surgery.

#### *Pharmacological interventions*

Seven days after surgery, standard drugs were tested to characterize the CCS model. Animals were randomized into six groups and received either morphine (4.0 mg/kg) (Hofmann et al., 2003) in 0.9% NaCl solvent, a synthetic CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> cannabinoid agonist (WIN 55,212-2) (5.0 mg/kg) in 0.9% NaCl + 40% dimethylsulfoxide (DMSO) solvent (Dogrul et al., 2004), gabapentin (50 mg/kg) (Hofmann et al., 2003; De Vry et al., 2004) or amitriptyline (10 mg/kg) (Esser and Sawynok, 1999), both in 0.9% NaCl. Two control



groups received either 0.9% NaCl or 0.9% NaCl+ 40% DMSO solvent. Each drug was administered intraperitoneally (i.p.) 40 min before testing in a volume of 15 mL/kg. The experimenter was blinded to the drug administered. In order to evaluate if any of the drugs injected had an effect *per se*, 24 naive mice were divided into six groups of four animals and received either morphine, WIN 55,212-2, gabapentin, amitriptyline or controls in the same solvents and at the same concentrations as CCS animals. Naive animals followed the same testing protocol as CCS mice with first baseline testing, then one week later, an assessment of vehicle or of pharmacological compounds. Therefore, time- and age-matched mice were compared to CCS animals.

### ***Immunohistochemistry***

One and seven days post surgery, mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) followed by a vascular rinse by intracardiac injection of NaCl 0.9% + 1UI/mL heparin and fixed by a perfusion of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1M pH 7.4). Each lumbar (L3-L4) spinal cord was removed and post-fixed in the same fixative solution for 3 h at 4°C and then transferred to 30% sucrose solution for cryoprotection overnight at 4°C and finally frozen sectioned at 30 µm every 150 µm at -20°C. Six to eight sections were taken from the lumbar segment (L3-L4) of the spinal cord of each mouse (CCS and sham at one and seven days post-surgery, n=4 per group). The labeling was performed using Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Briefly, sections were incubated in normal goat serum (1.5% in 0.01M phosphate buffer saline pH 7.4) for 20 min at room temperature (RT), then, incubated one hour at RT in polyclonal rabbit c-*fos* antiserum (1:4000, Sigma, St Louis, MI, USA) diluted in 0.01M phosphate buffer saline pH 7.4. The sections were then incubated in biotinylated goat anti-rabbit antibody solution (1:200) 30 min at RT, followed by avidin-biotine-peroxydase complex (1:100) 30 min at RT. The immune reaction was visualized by the catalysis of 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) by horseradish peroxydase in the presence of hydrogen peroxide solution and enhanced with nickel solution (DAB substrate kit for peroxydase,

Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Specificity of labeling was assessed by not incubating one slide of each group with the primary antibody.

Fos-like immunoreactivity dots were quantified microscopically (100× magnification) at the level of the dorsal horn of the spinal cord, ipsi- and contralaterally.

### ***Receptor expression***

#### ***Tissue sampling***

One or seven days after surgery, animals (naive, sham seven days post surgery, CCS one day and seven days post surgery, n = 36 per group) were euthanized with inhaled CO<sub>2</sub> and the ipsi- and contralateral foot skins and L3-L4 spinal cords were removed and snap frozen in liquid nitrogen. L3-L4 spinal cord samples were divided between ipsi- and contralateral sides (by using the posterior median sulcus of the spinal cord as a guide for sagittal section) in order to assess if receptor expression would be different between each side and also to see any contralateral changes in CCS animals compared to sham or naive mice.

#### ***Preparation of membrane fraction.***

Tissues from three to six mice were treated as a single subject for Western blot analysis. Membrane fraction was prepared to enrich receptors and facilitate their detection. This was done according to a modification of the procedure described by Nagahama et al. (2003). Frozen samples at the level of L3-L4 of the spinal cord or the shaved skin of the medial aspect of the operated paw were homogenized in ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 250 mM sucrose and 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) with a polytron. The homogenate was centrifuged at 120 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was centrifuged at 100 000 g for 90 min at 4°C. The pellet containing the enriched membrane fraction was resuspended in 0.9% NaCl containing 1% SDS and 1 mM PMSF and stored at –80°C until analysis.

*Western blot analysis*

The protein concentrations in samples were determined using BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Bovine serum albumin was used as reference protein. Samples (spinal cord: 50  $\mu$ g and skin: 35  $\mu$ g) were electrophoretically separated on 9% SDS-polyacrylamide gels and blotted on polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Receptor expression ( $\mu$  opioid receptor, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>) was evaluated using polyclonal goat anti-human CB<sub>1</sub> (1/100, Wright et al., 2005), rabbit anti-human MOR (1/200, Zhang et al., 2004) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and rabbit anti-human CB<sub>2</sub> (1/2000, Wotherspoon et al., 2005) from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), respectively. Primary antibodies were incubated with blot overnight at 4°C. Immune complexes for CB<sub>2</sub> and MOR were revealed by secondary antibody (swine anti-goat IgG from Biosource International and Goat anti-rabbit IgG from Sigma, Oakville, ON, Canada), coupled to peroxidase and the Luminol derivative of Lumi-Light plus Western blotting substrate (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). For CB<sub>1</sub>, rabbit anti-goat IgG coupled to alkaline phosphatases from Sigma was used with the chemiluminescent substrate CDP-Star from Roche Diagnostics. Immune reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry on a Fuji LAS-4000 digital camera.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a constitutively expressed protein was also measured by Western blot using a polyclonal rabbit anti-human GAPDH (1/1000) from ABCAM (Cambridge, MA) as a gel loading control.

Results are reported as a ratio of receptor on GAPDH expression. The reported values are percentages of the mean value obtained for the control samples. Each blot was done in duplicate.

Specificity of the antibodies against CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> was established by immunoneutralization of the antibody solution with specific synthetic peptide obtained from the manufacturers of the antibodies. By using 10 times excess of peptide, it was possible to determine that the major band observed in the control (non-neutralized) sample disappeared on the test blot. For MOR, the band which had a molecular weight corresponding to the

literature was measured. The bands had a molecular weight of 47 kDa for the CB<sub>1</sub> in spinal cord, 75 kDa CB<sub>1</sub> in paw skin, 47 and 43 kDa respectively for the CB<sub>2</sub> in spinal cord and skin and 56 and 64 kDa for the MOR in spinal cord and skin. GAPDH was detected at 35 kDa. A few other weak bands were also present but not used for the measurement of respective receptors.

### ***Electrophysiological recordings***

#### ***Skin-nerve preparation***

The mice skin-nerve *in vitro* preparation dissection was performed as described in rats by Reeh (1986) and adapted to mice by Koltzenburg et al. (1997). Briefly, the saphenous nerve was dissected free with the innervated dorsal paw skin. After the dissection the skin was pinned inside up on an organ bath constantly perfused (15 mL/min) with synthetic interstitial fluid (SIF) solution which contains in mM: NaCl, 108; KCl, 3.5; MgSO<sub>4</sub>, 0.69; NaHCO<sub>3</sub>, 26.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8; Na gluconate, 9.6; glucose, 5.6, saccharose, 7.6; CaCl<sub>2</sub>, 1.5. The SIF solution was gasified with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and maintained at a temperature of 32°C. The saphenous nerve was placed in a recording chamber overlaid with paraffin oil, the epineurium was pulled back and the whole nerve was placed on a silver electrode. A mapping of the receptive fields was performed by gently stimulating the chorium side of the skin with a blunt glass rod for naive and operated mice one or ten days before recordings (n=8 per group). For each group, two mice had their contralateral skin dissected, either before or after the ipsilateral side dissection. After that, for every dissection, spontaneous action potentials were recorded during 10 min using CED 1401 interface and Spike 2 software (CED Software, Cambridge, England) which enabled quantification of spikes that emerged from the background noise.

#### ***Statistical analysis***

Occurrence of allodynia and hyperalgesia, Fos-like immunoreactivity and electrophysiological analysis were determined by using one-way ANOVA with Dunn's

method for multiple comparisons between naive, sham and operated groups. The ipsi- and contralateral sides were analyzed separately. Drug effects were determined by using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test for comparing different treatments with the CCS control group at day seven. The effects of WIN 55,212-2 were determined by *t*-test using NaCl + 40% DMSO injection group as a control. Western blot results were compared by one-way ANOVA with Dunnett T3 post hoc tests for multiple comparisons versus tissues of normal subjects. Significant differences between ipsi- and contralateral values were compared using *t*-test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### *Development of neuropathic pain behavior*

From day one to day 28 post surgery, the ipsilateral hind paws of CCS animals became significantly more sensitive to acetone, von Frey hairs, suprathreshold von Frey hair stimulation and heat stimulation with plantar test compared to sham and naive animals which were not different (Fig 1, left panel). When the contralateral paw was stimulated, no difference between CCS, sham and naive animals was found (Fig 1, right panel), with the exception of one point in the plantar test at day one post surgery when the latency time in CCS mice was significantly lower compared to the naive animals (Fig 1D, right panel).

### *Drug testing*

#### *Controls*

Results from naive mice showed that the injection of the cannabinoid WIN 55,212-2 (5 mg/kg i.p. in NaCl + 40% DMSO) significantly reduced the response time after acetone application (Fig 2A, left panel). Amitriptyline increased sensitivity to mechanical stimulations on both side with von Frey hairs whether they were suprathreshold or not (Fig 2B and C, left panel). Other drugs did not significantly change sensory thresholds in each modality compared to naive time- and weight-matched mice (Fig 2, left panel). However, it was noticeable that the injection of NaCl + 40% DMSO alone induced clear signs of sedation that have also been observed with injection of WIN 55,212-2 which was also dissolved in 40% DMSO.

In CCS operated animals, saline injection did not induce any changes in sensitivity to acetone, von Frey hairs or laser stimulation compared to CCS time- and weight-matched mice which received no injection. Hence, the latter were used as controls for the evaluation of various drug treatments. In CCS mice, injection of solutions with 40% DMSO provoked sedation and this group showed significant increase in sensitivity thresholds after acetone application, suprathreshold von Frey stimulus and in the Plantar test. For this reason, results

of the WIN 55,212-2 group were compared with its control group (NaCl + 40% DMSO) (Fig 2, right panel).

#### *Drug effects on CCS mice*

On the ipsilateral side, morphine decreased sensitivity to acetone, increased mechanical thresholds and decreased the percentage of responses to supra threshold von Frey hairs significantly compared to the control group. Although the mean withdrawal latency increased with morphine, it was not significantly different from the CCS control animals. Contralateral side thresholds were not different from the control group (Fig 2 A-D right panel).

Gabapentin improved sensitivity thresholds in the four modalities tested on the ipsilateral side with no obvious difference when compared to contralateral paws (Fig 2 A-D, right panel).

Amitriptyline significantly reduced sensitivity to acetone on both the ipsi- and the contralateral sides (Fig 2A, right panel). The withdrawal latency time of the ipsilateral side increased in the plantar test (Fig 2D, right panel). Amitriptyline did not change mechanical thresholds or the percentage of positive responses after a supra threshold mechanical stimulus on the ipsilateral paws of CCS mice. Furthermore, contralateral sides were more sensitive to mechanical stimulation (Fig 2B and C, right panel).

WIN 55,212-2, compared to its own control, significantly reduced sensitivity thresholds in the four modalities tested. Naive mice exposed to acetone also displayed a significantly reduced sensitivity on both the ipsi- and contralateral sides.

#### *c-Fos expression*

Control sections of the spinal cord, taken from either one and seven days post surgery in CCS and sham groups, which were not incubated with the primary antibody, confirmed the specificity of the labelling. The labelling observed with the sham groups corresponded to the baseline expression of *c-fos*. One and seven days post surgery, CCS mice showed an

increase in the expression of *c-fos* in the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord compared to time-matched sham mice (Fig. 3). One day after surgery, the contralateral value of CCS animals was not different from the sham animals, whereas seven days post surgery, CCS animals showed an increase in the expression of *c-fos* on the contralateral side.

### ***Receptor expression***

In control animals, no difference was observed in the level of expression of CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> and MOR receptors between naive and sham animals.

Compared to naive mice, values of the three receptor expressions tested were significantly increased one and seven days post surgery on the ipsilateral side in both the spinal cord and the dorsal hind paw skin. Moreover, all ipsilateral values were significantly higher than the corresponding contralateral ones. Finally, no difference could be observed between one and seven days post surgery (Fig.4).

On the contralateral side, the level of expression of CB<sub>1</sub> was significantly increased compared to the naive group in the dorsal hind paw skin seven days after surgery (Fig. 4). In the spinal cord, we observed a significant increase of CB<sub>2</sub> receptor expression on the contralateral side after one and seven days post surgery.

### ***Skin-nerve preparation***

#### ***Mapping of functional receptive fields***

The mapping made on naive animals showed a classical innervation of the saphenous nerve, mostly in the medial part of the paw. The two mice from which both ipsi- and contralateral dissections were made showed that the preparations from both sides of the same animal are viable whether they are prepared in first or second position. One day after surgery, functional innervation of the skin was almost completely lost and recovered from the stem of the saphenous nerve ten days after. Contralateral sides of operated mice, at either one or ten days post surgery, were not different from the naive group (Fig. 5A).



*Spontaneous action potentials*

Recording of action potentials from the whole nerve of naive mice showed a baseline value of about 3 Hz. One day after surgery, operated animals displayed a significant decrease in spontaneous discharges whereas 10 days after, mice showed a significant increase in spontaneous activity of the whole nerve compared to naive mice (Fig. 5B).

## Discussion

We have shown that chronic constriction of the saphenous nerve (CCS) in mice induces rapid and persistent cold and mechanical allodynia, and mechanical and thermal hyperalgesia. Neuropathic pain induced by CCS is reduced by opioid and cannabinoid agonists and by gabapentin. Compared to our previous model of partial ligation of the saphenous nerve in rats, this model displays more clearly mechanical hyperalgesia and is more sensitive to gabapentin (Walczak et al., 2005). Furthermore, CCS induces rapid molecular rearrangements in the lumbar L3-L4 spinal cord and in the periphery. Finally, CCS induces electrophysiological changes in the receptive fields and in spontaneous activity of the saphenous nerve. Taken together, these findings help to dissect out the peripheral mechanisms responsible for the production of neuropathic pain which may lead to the discovery of new drugs.

In a study describing the time-course of neuropathic pain behavior after application of lysolecithin in mice, mechanical allodynia and thermal hyperalgesia occurred at seven days and lasted until 17-day post drug application (Wallace et al., 2003).

Mechanical allodynia and/or thermal hyperalgesia appeared after the chronic constriction injury on the sciatic nerve applied to C57BL/6 mice (Sommer et al., 1997; George et al., 2005) or partial sciatic nerve ligation on the sciatic nerve (Narita et al., 2004). This data corresponds to the rapid onset that we observed in our own model.

In fact, very few studies on neuropathic pain in mice showed the time-course of occurrence of allodynia and hyperalgesia observed in the present study. Furthermore, one of the strengths of the present model is that it affected significantly the four modalities tested. Moreover, since knock-out mice have a genetic background of C57BL/6 mice, our model is appropriate to the use of genetically modified mice.

### *Responses to drug treatments*

Although some studies reported negative results with morphine (Idänpään-Heikkilä and Guilbaud, 1999; Ohsawa et al., 2000), many studies have shown positive results in animal

models (Hoffmann et al., 2003; De Vry et al., 2004; Hama and Borsook, 2005) or in clinical studies (Rowbotham et al., 2003; Gilron et al., 2005). In the present study, systemic acute injection of morphine significantly prevented cold and mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. Thermal hyperalgesia was not attenuated in a significant manner which could be explained by the fact that the dose of 4 mg/kg i.p. was near the minimum effective dose against thermal hyperalgesia especially because the Plantar test was the last performed. Hence, a significant proportion of morphine could have been metabolized. However, recent studies in mice showed that partial ligation of the sciatic nerve decreased the antinociception induced by morphine after thermal stimulation (Narita et al., 2004) and that nerve injury induced  $\mu$ -opioid receptor mediated inhibition of mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia (Mansikka et al., 2004), which is in accordance with our findings. Gabapentin is an important adjuvant used in the treatment of neuropathic pain in clinics (Bennett and Simpson, 2004) and has been shown to alleviate allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain models (Hunter et al., 1997; Chapman et al., 1998) but with different results depending on the modality tested (Erichsen and Blackburn-Munro, 2002; Walczak et al., 2005). Regarding murine models of neuropathic pain, gabapentin alleviates neuropathic pain symptoms in the sciatic nerve ischemia model (Gustafsson et al., 2003), tumor-induced injury model (Peters et al., 2005) or in partial nerve injury (Tanabe et al., 2005). In CCS, gabapentin was also effective and we are the first to show that gabapentin can alleviate cold and mechanical allodynia as well as mechanical and thermal hyperalgesia in mice.

Only one study looked at the effect of amitriptyline against mechanical allodynia and hyperalgesia in a mouse model of acute herpetic pain and it showed, as in the present study, that it was not efficient against these mechanical stimulations (Takasaki et al., 2000). Contrary to Takasaki et al. (2000), we showed that amitriptyline induced hypersensitivity to mechanical stimulation on the contralateral paws of CCS mice as well as both paws in naive mice. We had already observed this tactile hyperesthesia in neuropathic and even naive rats (Walczak et al., 2005) which was previously described after acute (Esser and

Sawynok, 1999) or chronic administration of amitriptyline (Esser et al., 2001). That study showed that the tactile hyperaesthesia was exacerbated by chronic administration of caffeine (a non specific adenosine receptor A<sub>1</sub> A<sub>2</sub> antagonist) demonstrating that adenosine receptors regulate tactile hyperaesthesia. However, the mechanisms of the tactile hyperalgesia induced by amitriptyline remain unclear.

In CCS mice, injection of the cannabinoid agonist WIN 55, 212-2 dissolved in 40% DMSO was anti-allodynic and anti-hyperalgesic in the four modalities tested, but it is noticeable that WIN 55, 212-2 with its solvent was clearly hypoalgesic. The first cause of this hypoalgesia is probably the vehicle (saline + 40% DMSO) because alone, it induced clear sedative effects. Previous studies looking at the effects of DMSO reported hypolocomotion (Castro et al., 1995) and increased potency of barbiturates (Stock and Fouts, 1971). Furthermore, DMSO has analgesic properties: it reduces nerve conduction velocity (Cavaletti et al., 2000) and is approved for the treatment of interstitial cystitis-related pain (Sant and LaRock, 1994; Castroman and Ness, 2002). The difference with observations in rats could be explained by the volume of injection per weight, which is much more important in mice even using the same proportion of DMSO. A recent study in mice looked at systemic injection of WIN 55, 212-2 in 50% DMSO which significantly improved all signs of allodynia and hyperalgesia tested (Dogrul et al., 2004).

### *Neurobiological rearrangements*

The anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of morphine and WIN 55, 212-2 could be explained by the increase in the expression of the  $\mu$  opioid receptor (MOR) and cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors after CCS injury. Indeed, specific activation of MOR (Mansikka et al., 2004; Obara et al., 2004), CB<sub>1</sub> (Fox et al., 2001; Lim et al., 2003) or CB<sub>2</sub> receptors (Ibrahim et al., 2005; Valenzano et al., 2005) can alleviate symptoms of neuropathic pain.

Studies looking at the expression of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> after nerve injury showed an increased expression: CB<sub>1</sub> after CCI (Lim et al., 2003), with an onset of overexpression four days

post surgery; CB<sub>2</sub> after CCI and spinal nerve ligation (Zhang et al, 2003). Expression of MOR after nerve injury gave various results but is mostly reported to be decreased (Goff et al., 1998; Rashid et al., 2004). However, either a local increase after CCI (Truong et al., 2003) or no change in the spinal cord (Wang et al., 2001; Chen and Pan, 2003) is reported. Many reasons could provoke this discrepancy in MOR expression in neuropathic pain such as the strain of mice that is used or the technical approach used to evaluate MOR expression. The type of neuropathy could also be a reason. In our study the main difference is that the saphenous nerve is exclusively sensory, then, the observed increase in MOR expression could be due to this property of the model since we previously observed that MOR expression was increased in the skin, the dorsal root ganglia and spinal cord of rats that had a lesion to the saphenous nerve (Walczak et al., 2005). As mentioned earlier, it is noticeable that the increase in MOR expression is in accordance with the anti allodynic and hyperalgesic effects of morphine that we and other authors observed.

The expression of c-Fos, which is an immediate early gene, is increased after diverse types of stimulations and forms with c-Jun, a heterodimer, which then activates gene transcription (Chapman and Besson, 1997). Nerve injury can induce an increase in c-Fos expression and has been reported in mice (Li and Clark, 2003; Shimoyama et al., 2005). The induction of c-Fos expression is indicative of increased neuronal activity in the dorsal horn of the spinal cord.

#### *Skin-nerve preparation*

Recording the whole nerve with the skin-nerve preparation does not allow the recording of C-fiber action potentials because of their small amplitude, whereas A-fiber spikes remain at substantial amplitude. Even after nerve injury, Schwann cells, connective tissue and blood vessels short-circuit the small extracellular currents of unmyelinated cells. Hence, all the recordings that we performed on the whole saphenous nerve were A-fiber action potentials (P. Reeh, personal communication).

The three ligations around the saphenous nerve almost prevented the recording of action potentials evoked by the stimulation of the skin receptive field one day after surgery whereas the functional innervation territory partially recovered 10 days after. There is, however, incongruity in the fact that when stimulating the receptive fields in behavioral tests, operated mice displayed allodynia and hyperalgesia one and ten days after surgery. Various reasons might explain this: (1) as we only record A-fibers (whole nerve) in the skin-nerve preparation, it is possible that in behavioral tests, C-fibers are stimulated, being able to conduct nociceptive information from the cutaneous innervation; (2) after surgery, destruction of myelin begins after 24 – 48 h which could explain the absence of A-fiber recording (Koeppen, 2004); (3) extra territorial pain could be another explanation.

In naive mice, the recorded spontaneous activity corresponds to slowly adapting type II fibers that respond to the tension of the skin pinned on the bath (P. Reeh, personal communication). Thus, this activity is mediated through A $\beta$ -fibers and is principally an artefact of the preparation. The significant decrease in spontaneous activity observed one day after surgery would be a direct consequence of the lowered receptive field area in the skin. On the contrary, even after a growth in innervation 10 days after surgery, functional innervation has not completely recovered but we observed a significant increase in spontaneous discharges. Since the ligations are downstream from the recording electrode, these ectopic action potentials can come from the neuroma, thus explaining the behavior indicative of neuropathic pain that we observed.

In conclusion, chronic constriction of the saphenous nerve in mice is a new, easily performed, neuropathic pain model made on an exclusively sensory nerve. It displays rapid signs of allodynia and hyperalgesia, and is sensitive to different classes of drugs that were effective against neuropathic pain. We also showed that the injury induced rapid molecular rearrangement in the spinal cord and in the periphery and a biphasic electrophysiological response in the periphery. This purely sensory nerve model combined with genetically

modified mice and skin-nerve preparation will help to better understand the pathophysiology of neuropathic pain in the periphery.

**Acknowledgments**

We are very grateful to Peter W. Reeh (Erlangen University, Germany) for his very helpful comments in interpreting the skin-nerve electrophysiological data.

## References

- Bennett GJ, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Bennett MI, Simpson KH. 2004. Gabapentin in the treatment of neuropathic pain. *Palliat Med* 18:5-11.
- Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR. 1995. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav* 50:521-526.
- Castroman PJ, Ness TJ. 2002. Spinal neurophysiologic correlates of the analgesic actions of intravesical dimethyl sulfoxide and capsaicin in the rat. *J Pain* 3:394-400.
- Cavaletti G, Oggioni N, Sala F, Pezzoni G, Cavalletti E, Marmiroli P, Petruccioli MG, Frattola L, Tredici G. 2000. Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. *Toxicol Lett* 118:103-107.
- Chapman V, Besson JM. 1997. Pharmacological studies of nociceptive systems using the c-Fos immunohistochemical technique: An indicator of noxiously activated spinal neurones. In: Dickenson A, Besson JM, editors. *The pharmacology of pain*. Berlin: Springer, p 235-279.
- Chapman V, Suzuki R, Chamarette HL, Rygh LJ, Dickenson AH. 1998. Effects of systemic carbamazepine and gabapentin on spinal neuronal responses in spinal nerve ligated rats. *Pain* 75:261-272.
- Chen SR, Pan HL. 2003. Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats. *Anesthesiology* 99:1409-1414.
- De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G. 2004. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 491:137-148.
- Dogrul A, Gul H, Yildiz O, Bilgin F, Guzeldemir ME. 2004. Cannabinoids blocks tactile allodynia in diabetic mice without attenuation of its antinociceptive effect. *Neurosci Lett* 368:82-86.
- Erichsen HK, Blackburn-Munro G. 2002. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain* 98:151-161.



Esser MJ, Chase T, Allen GV, Sawynok J. 2001. Chronic administration of amitriptyline and caffeine in a rat model of neuropathic pain: multiple interactions. *Eur J Pharmacol* 430:211-218.

Esser MJ, Sawynok J. 1999. Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptoms and route effects. *Pain* 80:643-653.

Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I. 2001. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92:91-100.

Fu W-M, Chang T-K, Sun W-Z, Ling Q-D, Peng H-C, Liou H-C, Lu D-Y, Huang T-F. 2004. Inhibition of neuropathic pain by a potent disintegrin – triflavin. *Neurosci Lett* 368:263-268.

George A, Buehl A, Sommer C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. 2005. *Exp Neurol* 192:163-166.

Gilron I, Bailey JM, Tu D, Holden RR, Weaver DF, Houlden RL. 2005. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *N Engl J Med* 352:1324-1334.

Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L. 1998. Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 82:559-574.

Gustafsson H, Flood K, Berge OG, Brodin E, Olgart L, Stiller CO. 2003. Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. *Exp Neurol* 182:427-434.

Hama AT, Borsook D. 2005. Behavioral and pharmacological characterization of a distal peripheral nerve injury in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 81:170-181.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.

Hofmann HA, De Vry J, Siegling A, Spreyer P, Denzer D. 2003. Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 470:17-25.

Hunter JC, Gogas KR, Hedley LR, Jacobson LO, Kassotakis L, Thompson J, Fontana DJ. 1997. The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *Eur J Pharmacol* 324:153-160.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. 2005. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3093-3098.

Idänpään-Heikkilä JJ, Guilbaud G. 1999. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain* 79:281-290.

Koeppen AH. 2004. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 220:115-117.

Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR. 1997. Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 78:1841-1850.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597-652.

Li X, Clark JD. 2003. Heme oxygenase type 2 participates in the development of chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain* 4:101-107.

Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J. 2003. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain* 105:275-283.

Malmberg AB, Zeitz KP. 2004. Studies of pain mechanisms in genetically manipulated mice. In: Mogil JS, editor. *The genetics of pain*. Seattle: IASP Press. p 21-48.

Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl G, Raja SN. 2004. Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. *Anesthesiology* 100:912-921.

Nagahama K, Yamato M, Kato S, Takeuchi K. 2003. Protective effect of lafutidine, a novel H(2)-receptor antagonist, on reflux esophagitis in rats through capsaicin-sensitive afferent neurons. *J Pharmacol Sci* 93:55-61.

Narita M, Suzuki M, Imai S, Narita M, Ozaki S, Kishimoto Y, Oe K, Yajima Y, Yamazaki M, Suzuki T. 2004. Molecular mechanism of changes in the morphine-induced pharmacological actions under chronic pain-like state: suppression of dopaminergic transmission in the brain. *Life Sci* 74:2655-2673.

- Obara I, Przewlocki R, Przewlocka B. 2004. Local peripheral effects of mu-opioid receptor agonists in neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 360:85-89.
- Ohsawa M, Mizoguchi H, Narita M, Narita M, Kamei J, Nagase H, Tseng LF. 2000. Effects of a  $\mu$ -opioid receptor agonist on G-protein activation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 401:55-58.
- Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, Kubota K, Lindsay TH, Luger NM, Mach DB, Schwei MJ, Sevcik MA, Mantyh PW. 2005. Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain. *Exp Neurol* 193:85-100.
- Rashid MH, Inoue M, Toda K, Ueda H. 2004. Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309:380-387.
- Reeh PW. 1986. Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 66:141-146.
- Rowbotham MC, Twilling L, Davies PS, Reisner L, Taylor K, Mohr D. 2003. Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. *N Engl J Med* 348:1223-1232.
- Roza C, Laird JM, Souslova V, Wood JN, Cervero F. 2003. The tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. *J Physiol* 550:921-926.
- Sant GR, LaRock DR. Standard intravesical therapies for interstitial cystitis. 1994. *Urol Clin North Am* 21:73-83.
- Shimoyama M, Tatsuoka H, Ohtori S, Tanaka K, Shimoyama N. 2005. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain* 114:221-230.
- Stock BH, Fouts JR. 1971. The influence of in vivo administration of dimethyl sulfoxide on the in vitro metabolism of some monocyclic aromatic chemicals by hepatic microsomal preparations. *Toxicol Appl Pharmacol* 18:859-868.
- Smith SB, Crager SE, Mogil JS. 2004. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sci* 74:2593-2604.
- Sommer C, Schmidt C, George A, Toyka KV. 1997. A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett* 237:45-48.

- Takasaki I, Andoh T, Nitta M, Takahata H, Nemoto H, Shiraki K, Nojima H, Kuraishi Y. 2000. Pharmacological and immunohistochemical characterization of a mouse model of acute herpetic pain. *Jpn J Pharmacol* 83:319-326.
- Tal M, Bennett GJ. 1994. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57:375-382.
- Tanabe M, Takasu K, Kasuya N, Shimizu S, Honda M, Ono H. 2005. Role of descending noradrenergic system and spinal  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. *Br J Pharmacol* 144:703-714.
- Truong Z, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW. 2003.  $\mu$  opioid receptors and analgesia at the site of peripheral nerve injury. *Ann Neurol* 53:366-375.
- Valenzano KJ, Tafesse L, Lee G, Harrison JE, Boulet JM, Gottshall SL, Mark L, Pearson MS, Miller W, Shan S, Rabadi L, Rotshteyn Y, Chaffer SM, Turchin PI, Elsemore DA, Toth M, Koetzner L, Whiteside GT. 2005. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology* 48:658-672.
- Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. 2005. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: A new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132:1093-1102.
- Wallace VC, Cottrell DF, Brophy PJ, Fleetwood-Walker SM. 2003. Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids. *J Neurosci* 23:3221-3233.
- Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Brennan MB, Hochgeschwender U, Hruby VJ, Malan TP Jr, Lai J, Porreca F. 2001. Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 21:1779-1786.
- Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. 2005. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* 135:235-245.
- Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, Welham M, Ward S. 2005. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 129:437-453.

Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D. 2003. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 17:2750-2754.

Zhang N, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ. 2004. Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *J Immunol* 173:594-599.

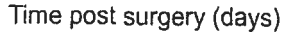


Figure 2

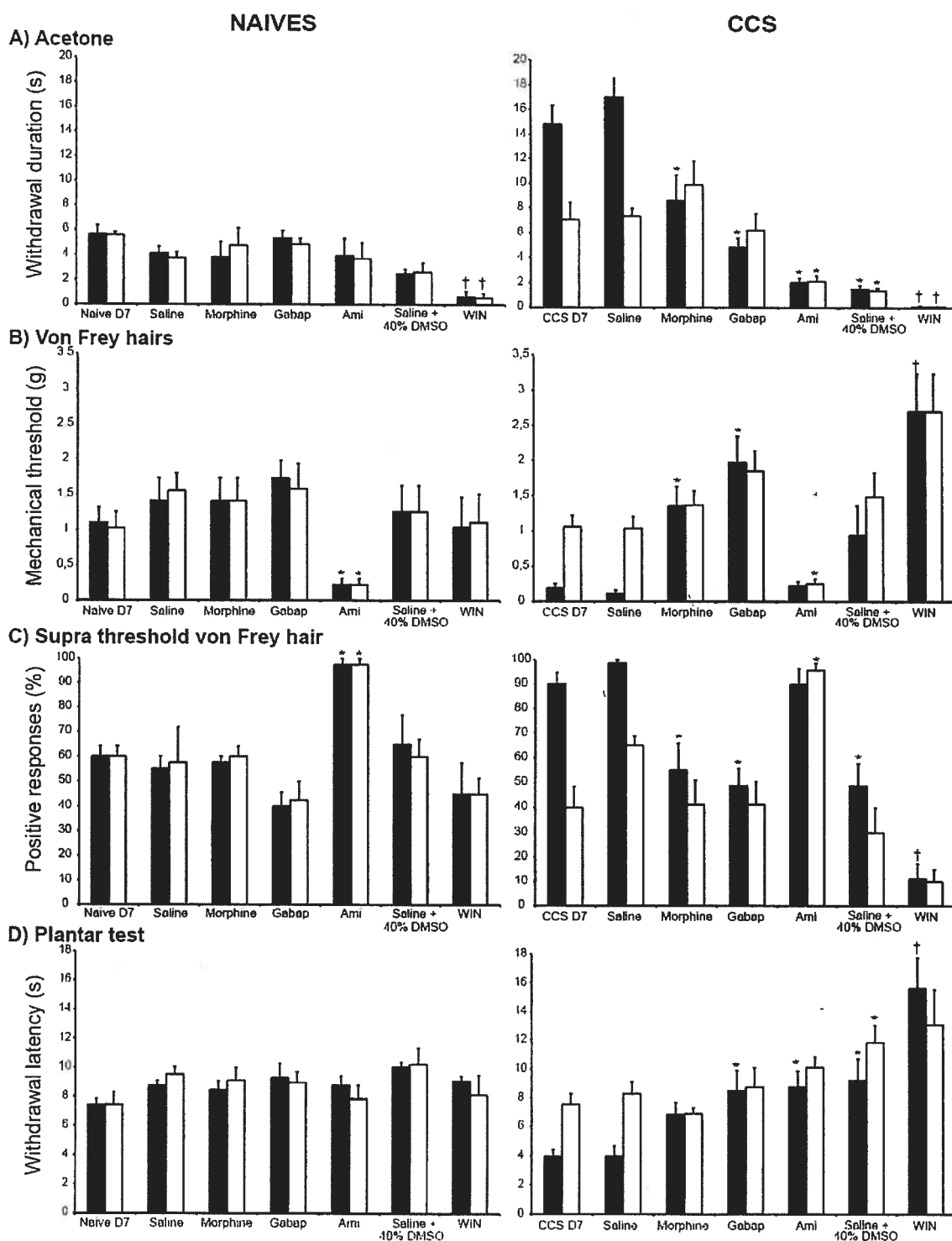


Figure 3

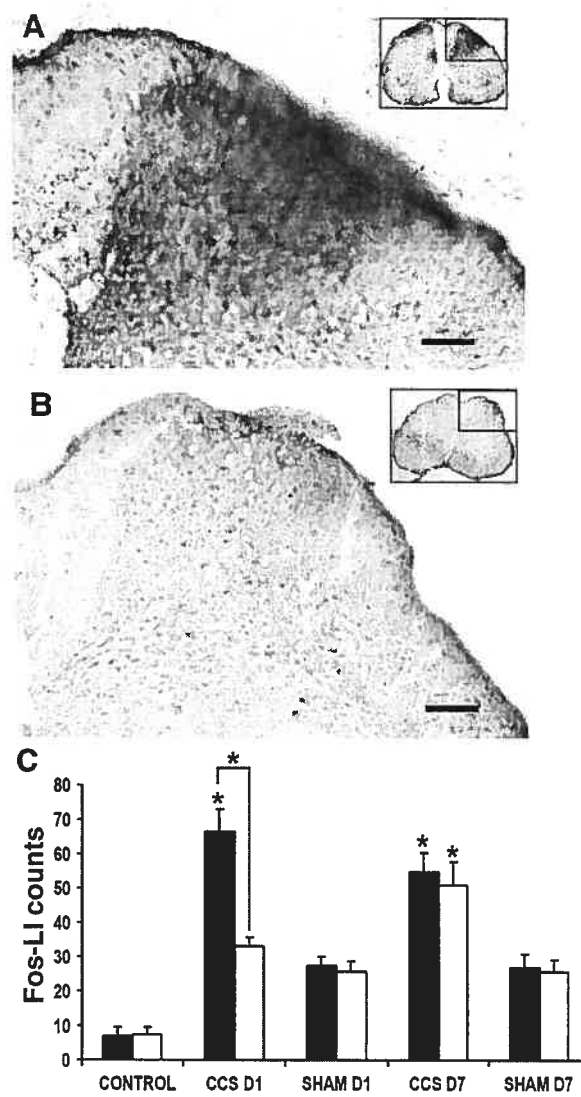




Figure 4

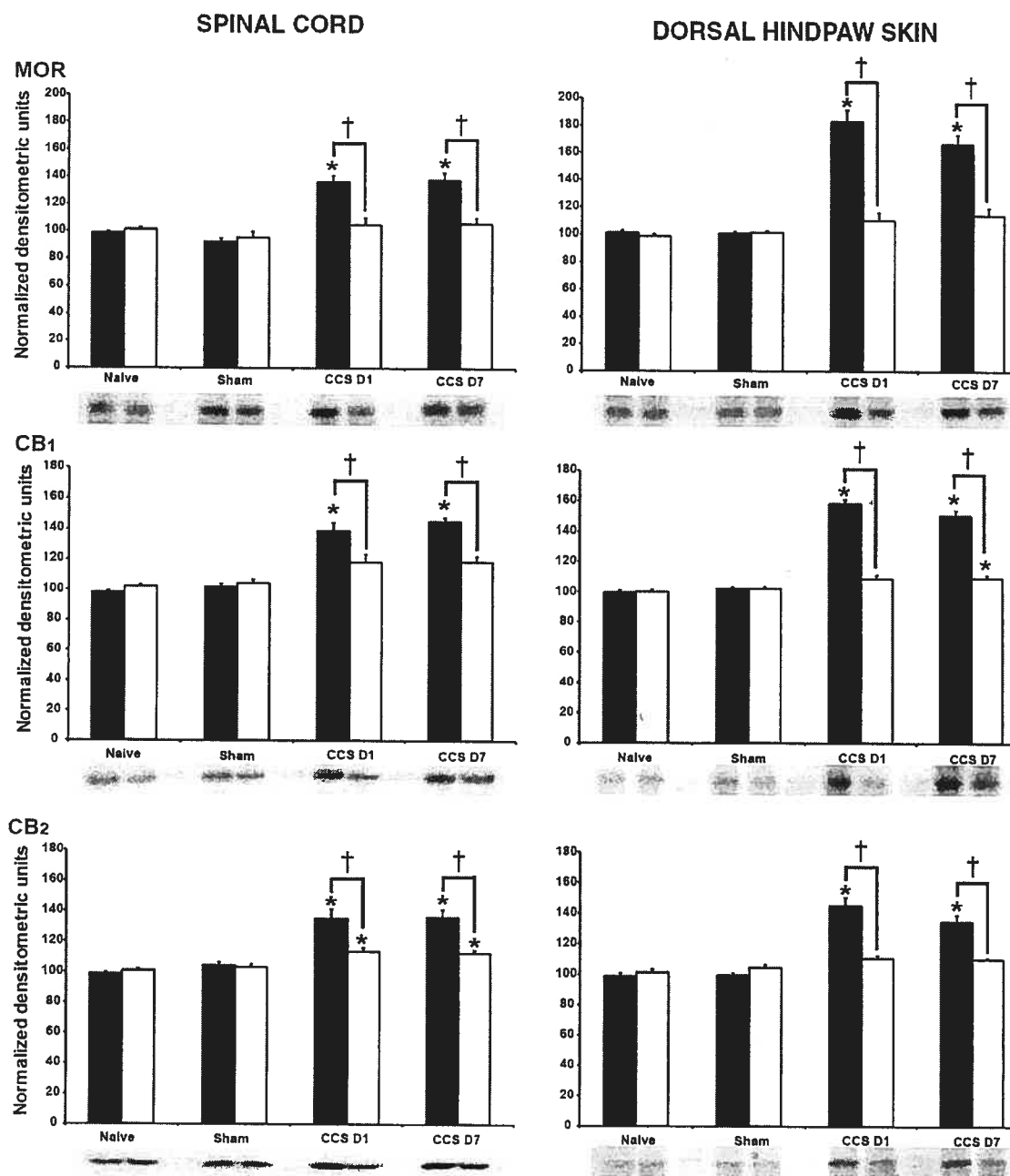
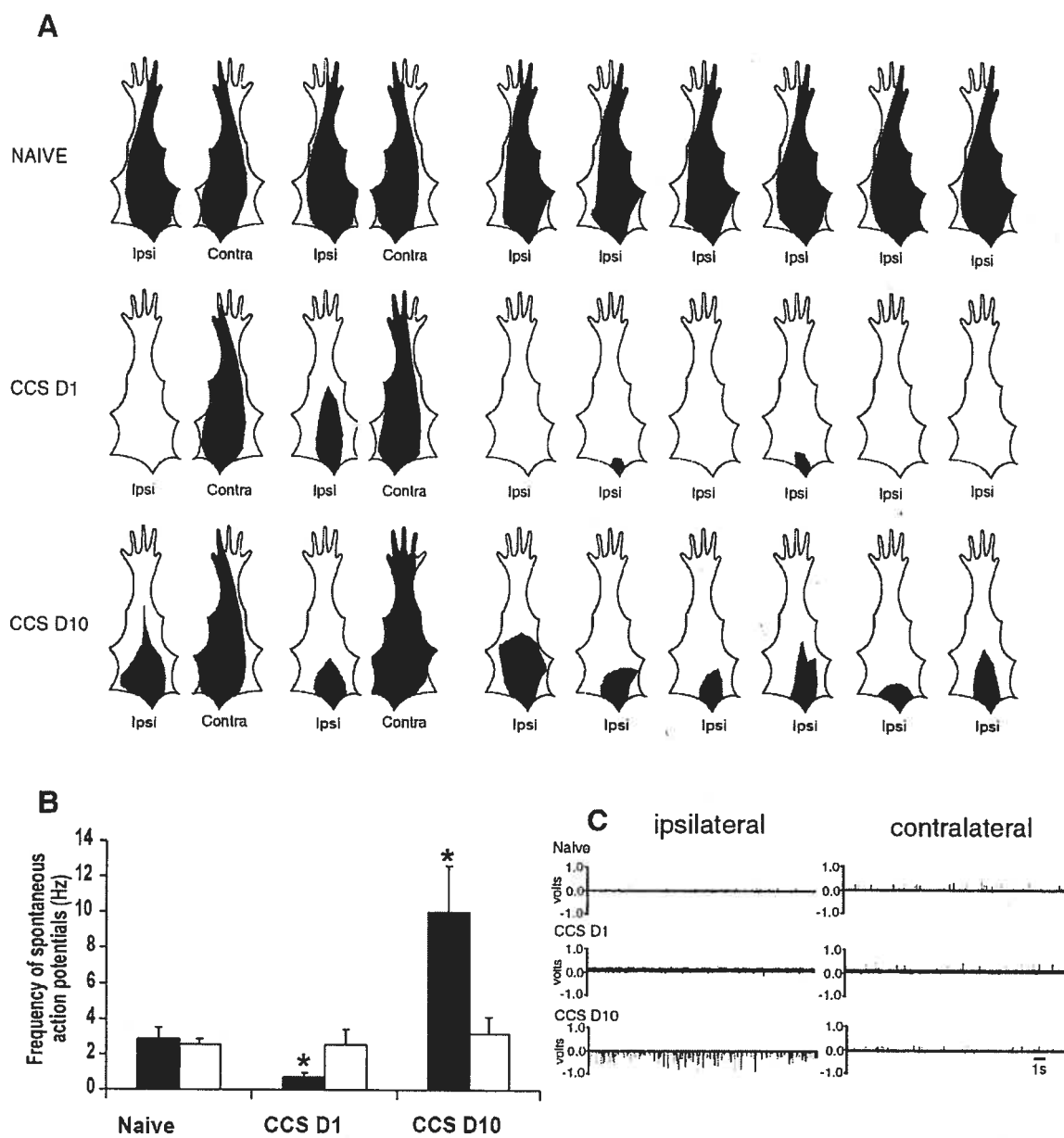


Figure 5



### Legends for Figures

Fig. 1. Time course of sensitivity to acetone (A), von Frey hairs (B), suprathreshold von Frey hairs (C) and Plantar test (D) in chronic constriction of the saphenous nerve (CCS), sham or naive mice ( $n=12$  per group). Results are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs. naive; #  $P < 0.05$  versus sham. Solid line: CCS; dashed line: sham; dotted line: naive animals.

Fig. 2. Effects of i.p. morphine (4 mg/kg), gabapentin (50 mg/kg), amitriptyline (10 mg/kg) in 0.9% saline vehicle and WIN 55, 212-2 (5 mg/kg) in 0.9% saline + 40% DMSO vehicle, on naive and CCS neuropathic mice seven days after surgery. Drug effects were compared by one-way ANOVA (\*) except for WIN 55,212-2, which was compared to its vehicle injection group using  $t$ -test ( $\dagger$ ). Results are mean  $\pm$  SEM. (\*  $P < 0.05$  vs. naive day seven group on the left panel and CCS D7 group on the right panel) ( $\dagger P < 0.05$ ). (black bars = ipsilateral side; white bars = contralateral side)

Fig. 3. Fos expression in the lumbar (L3-L4) spinal cord induced after chronic constriction of the saphenous nerve and sham mice at one and seven days post surgery. (A) and (B) are the microphotographs of the ipsilateral dorsal lumbar section of CCS and sham animals, respectively, one day post surgery illustrating the distribution of c-fos expression (scale bar: 100  $\mu$ m). The entire lumbar section is added on the right corner of the photographs. (C) shows the number of Fos-like immunoreactivity (Fos-LI) counted in either the ipsilateral (black bars) or contralateral (white bars) side of the dorsal horns of the spinal cord. The control group shows sections that were not incubated with the anti c-fos antibody. Results are mean  $\pm$  SEM. (\*  $P < 0.05$  vs. corresponding sham group).

Fig. 4. Western blot analysis of  $\mu$  opioid receptor (MOR), CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in lumbar L3-L4 spinal cord and the dorsal hind paw skin of either ipsi- (black bars) or contralateral (white bars) samples. The reported values are percentages of the mean value ( $n = 6$  subjects, with one subject corresponding to 3 to 6 mice) obtained for the naive samples and expressed for sham and chronic constriction of the saphenous nerve (CCS) animals at one and seven days post surgery. (\* one-way ANOVA,  $P < 0.05$  vs. naive group). (†  $t$ -test,  $P < 0.05$  for ipsi- vs. contralateral values comparisons).

Fig. 5. (A) Mapping of functional innervation in black of the saphenous nerve using the skin-nerve preparation in naive and chronic constriction of the saphenous nerve in mice at one and ten days post surgery ( $n=8$  per group). (B) Frequency of spontaneous action potentials in naive and CCS mice at day one and day ten for the ipsilateral paw ( $n=8$  per group). Results are mean  $\pm$  SEM (\* one-way ANOVA  $P < 0.05$  vs. naive group). Contralateral values ( $n=2$ ) are indicative but no statistical analysis was performed. (C) Representative example of electrophysiological recording that was obtained.

### Article n° 3

Titre: "Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique."

Auteurs : Jean-Sébastien Walczak<sup>1</sup> et Pierre Beaulieu<sup>1,2</sup>

Département de Pharmacologie<sup>1</sup> - Université de Montréal, Département d'Anesthésiologie<sup>2</sup>  
- Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Revue : *Neuroscience Letters*, année : 2006, volume 399, pages : 240-244.

Title:

**Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique.**

Authors:

Jean-Sébastien Walczak<sup>1</sup>, Pierre Beaulieu<sup>1,2\*</sup>

(1) Department of Pharmacology - Université de Montréal, (2) Department of Anesthesiology - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

Number of pages of the manuscript (including figures): 20

Number of figures: 5

\*Corresponding author: Université de Montréal, Department of Pharmacology. C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Phone: (514) 343-6338

Fax: (514) 343-2291

E-mail: [REDACTED]

**Abstract**

The recent identification of receptors sensitive to cold stimuli increased the significance of using mice to study cold allodynia, one of the important features of neuropathic pain. However, commonly used techniques (simple cold plate and acetone technique) may be inappropriate to study cold allodynia in mice because of problems of interpretation. We have developed a new method for assessing aversion to a cold non-noxious stimulus. It consists of calculating the time that mice spend on a non-noxious cold plate during their explorative behavior versus a thermoneutral one. We used three different models of neuropathic pain: chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI), partial sciatic nerve ligation (PSL) and chronic constriction of the saphenous nerve (CCS) with their respective sham groups and naive animals to assess the double plate in comparison to the acetone drop technique. All operated mice displayed cold allodynia with both methods. The response to acetone and the time spent on the cold plate were correlated ( $r = -0.93$ ) and we also showed that the CCI mice were more sensitive to cold. Pharmacological validation of this technique showed that CCI induced cold allodynia was alleviated by gabapentin. In conclusion, the double plate technique provides a new, relevant method for assessing cold allodynia in mice. The advantages and drawbacks with the other techniques are discussed.

**Keywords:** Cold allodynia; mice; neuropathic pain; double plate; acetone.

Cold allodynia is one of the main symptoms of neuropathic pain [23]. Animal models have described cold allodynia using two different techniques: the cold plate [2, 10, 17] and the acetone drop technique [4, 5]. Mouse models of neuropathic pain are interesting to understand mechanisms of cold allodynia by giving the possibility of using genetically modified mice, especially since the recent identification of cold receptors [14, 16].

The assessment of cold allodynia in mice can lead to difficulties of interpretation. Indeed, paw lifting after acetone application may be due to the combined effects of cold allodynia, chemical stimuli, and to a certain extent mechanical stimulation [7]. In addition, the problem with mice is that even control animals always respond positively to acetone [12, 18], whereas rats respond very rarely to acetone under normal conditions [4].

For the cold plate technique, its temperature (5°C) should be considered as noxious cold since a temperature below 15°C is thought to be painful [13, 19]. Consequently, tests performed using mice do not really reflect cold allodynia because aversive noxious stimuli are applied.

To circumvent these problems, we developed a new technique to evaluate cold allodynia in three different models of neuropathic pain in mice: Chronic constriction injury (CCI) [2], partial sciatic nerve ligation (PSL) [17] and chronic constriction of the saphenous nerve [2, 21]. The double plate method consists of measuring the time that mice spend on a cold vs. a thermoneutral plate during their explorative behavior. The cold plate, regulated at 18°C would reflect a real allodynic stimulus. In addition, this test allows mice to escape a fierce or painful stimulus. These results were compared with the acetone drop technique to assess the reliability of this new method. Different behavioral controls as well as a pharmacological validation of this model have been performed.

All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines. Mice were housed 3-4 per cage and maintained on a 12-h dark-light cycle with free access to food and water. Male C57BL/6 mice (Charles River, Canada), weighing 20-25 g were divided into six groups: CCS (1) and its sham (2) group, CCI (3) and PSL (4) with the same



sham (5) group and a naive (6) group ( $n=8-12$  per group). Mice had double plate and acetone drop testing 7 to 14 days post-surgery with at least one day between the two. Forty-eight mice were used with the double plate for pharmacological characterization. Each animal was exposed once to the acetone and the double plate techniques, both at room temperature and then for the double plate one at 31°C and the other at 18°C. In addition, 48 mice were used for different behavioral controls (variations of duration of testing period and temperature, habituation).

For CCI and PSL, surgery was performed under isoflurane in oxygen. Nerve injuries were made with 8.0 Nylon (Sherwood Medical, St Louis, USA). The left common sciatic nerve was exposed at middle thigh level. Proximal to the nerve's trifurcation, 5-7 mm of nerve was freed of adhering tissue and three ligatures were tied loosely around it with about 1 mm spacing for CCI [2], or 50% of the nerve was tightly entrapped in one ligature for PSL [17]. Muscle and skin incisions were closed. The entire surgery was performed without the ligatures for sham-operated mice.

For CCS surgery, a small incision (5 mm) was made transversal to the saphenous nerve on the anterior surface of the right thigh, 8 mm medial to the anterior superior iliac spine. In the injured group, three loose ligatures, spaced at 1mm, made around the nerve circumference were performed, whereas in the sham-operated group, the nerve was left intact [2, 21].

The acetone drop technique consisted of placing 20  $\mu$ L of acetone on the plantar surface of the hind paws. The time the animal spent lifting, licking or shaking the paw was recorded during one minute. Three measurements were done and averaged for each paw [18].

The double plate experimental device comprised two metal plates (15x12 cm each) separated by 5 mm of silicone (Sylgard, Dow Corning, USA) to avoid thermal exchange between the plates. Each plate was connected with tubes to warm or cold baths. A peristaltic pump (Harvard Apparatus, USA) allowed constant circulation of water. During cold allodynia testing, one plate was regulated with a warming device (Isotemp, Fischer

Scientific, USA) at a thermoneutral temperature ( $31^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). The cold plate was regulated at  $18^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  with an iced-water bath. During tests, the temperature of each plate was controlled by a double-probe thermometer (Fisher Scientific, USA). A Plexiglas cage (19x12x11 cm) was placed on the two plates in order to have an equal surface of each temperature regulated floor.

In cold allodynia testing, mice were first placed on the neutral plate and recording started with the beginning of explorative behavior. The exploratory period was used to record the time the operated paw spent in contact with the cold plate during 10 min. When both plates were at room temperature, the same procedure was applied with one plate arbitrarily taken for reference.

To assess if the duration of observation would change the sensitivity of the double plate test, CCI and naive mice ( $n=8$  per group) were assessed with plates at  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 5, 10 and 15 minutes.

To ensure that the observed behavior was related to cold, CCI and naive mice ( $n=8$  per group) were evaluated with different temperatures on one side of the plate ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) while the other remained thermoneutral. These tests were made with the same animals with at least two days in between. The data obtained with one plate at  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  were added for comparison.

An eventual habituation was evaluated with naive and CCI animals tested first with plates at  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  and then the day after with both plates at room temperature ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). The rationale being that during the test with both plates at room temperature, if animals spend less time on the plate that was previously cold, habituation occurred.

Furthermore, eight animals from each group were tested on the double plate (both at room temperature,  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) to see if mice had no basal preference for one particular side. The number of walking-throughs the midline was calculated to see if surgery had any effect on locomotion. This method has been used on 24 CCI mice to assess the effects of the drugs tested on explorative behavior.

Finally, CCI mice ( $n = 8$  per group) were randomly dispatched between three groups receiving, 45 min before being cold allodynia testing, intraperitoneal (12 mL/kg) gabapentin (50 mg/kg) [6, 9], amitriptyline (10 mg/kg) [8], both in 0.9% NaCl, or the saline solvent. The experimenter was blinded to the drug administered.

Statistical significance was determined by one-way ANOVA with Bonferroni  $t$ -test for post-hoc multiple comparisons.  $t$ -test were used to compare naive and CCI animals for one temperature during the assessment of variation of temperature and for drug comparison.  $P < 0.05$  was considered significant. (SigmaStat, Jandel Corporation, USA).

Naive mice had a basal response of  $5.3 \pm 0.4$  s (mean  $\pm$  SEM) after application of acetone on the hind paw. Sham animals behaved similarly and were not different from naive mice. However, all operated mice displayed an increased response after acetone application on the ipsilateral paw. They were significantly different from the naive and their respective sham-operated groups. Moreover, CCI mice showed a significantly higher response than PSL and CCS mice which behaved similarly (Fig. 1).

When both plates were at room temperature, all mice spent an equal time on each plate. Furthermore, the number of crossings through the midline of the cage for sham and operated mice was not different from naive mice (Fig. 2A). Hence, neither sham surgery nor nerve lesion had an effect on the explorative behavior, although mice with a sciatic nerve lesion displayed claudication, contrary to controls and mice operated on the saphenous nerve.

During cold testing, the temperatures of the plates were:  $30.6 \pm 0.11^\circ\text{C}$  for the neutral and  $17.8 \pm 0.07^\circ\text{C}$  for the cold plate. Mice spent less time on the cold plate but, compared to the naive and sham groups, CCI, PSL and CCS mice spent significantly even less time. Additionally, CCI mice spent significantly less time on the cold plate than the PSL group (Fig. 2B). Animals with injuries to the sciatic nerve had the ipsilateral paw ventroflexed and bared less weight on it. However, the ipsilateral paw was in contact with the cold plate when they walked on it. In addition, although there was no ventroflexion of the paw with

the CCS model, the time spent on the cold plate was significantly reduced as well. Mice also preferred to return to the neutral plate rather than to stand on the cold one and to lift the ipsilateral paw, excluding then any problems of interpretation due to motor deficit induced by surgery on the sciatic nerve.

There was a negative correlation between the time of paw withdrawal after application of acetone and the time spent on the cold plate ( $r = -0.93$ ) (Fig. 3).

The variation of duration of testing neither modified the percentage spent by naïve and CCI mice on the cold plate nor the level of significance between the two groups ( $P < 0.001$  for 5, 10 and 15 minutes tested) (data not shown).

The recorded temperatures of the plates were for each series of test (left plate/right plate, mean  $\pm$  SEM):  $30.6 \pm 0.11^\circ\text{C} / 17.8 \pm 0.07^\circ\text{C}$ ;  $30.5 \pm 0.13^\circ\text{C} / 22.0 \pm 0.15^\circ\text{C}$ ;  $30.8 \pm 0.10^\circ\text{C} / 26.0 \pm 0.12^\circ\text{C}$  and  $30.6 \pm 0.12^\circ\text{C} / 30.7 \pm 0.11^\circ\text{C}$ . Both naïve and CCI mice, spent less and less time on the cold plate when its temperature decreased from 31 to 22 and  $18^\circ\text{C}$ , and CCI mice significantly so compared to naïve mice for the last two temperatures. For naïve and CCI mice, the time spent on the plates at 22, 26 and  $31 \pm 1^\circ\text{C}$  was significantly higher than that spent at  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . The coefficients of correlation between the time spent on the cold plate and the temperature of the plate were  $r = 0.98$  and  $r = 0.95$  for naïve and CCI mice, respectively (Fig. 4).

Finally, CCI and naïve mice did not show habituation since when tested with both plates at room temperature, naïve mice spent  $49 \pm 4\%$  of the time on the plate that was cold the day before. However, since the mean percentage of time of CCI mice was reduced ( $41 \pm 2\%$ ), although not significantly, we would recommend inverting the cold and neutral plates between two tests if repeated measures with cold plate are needed (data not shown).

Amitriptyline injection induced sedative effects that significantly reduced the number of time the animals crossed the midline when both plates were at room temperature (Fig. 5A). Hence this group had to be excluded from the analysis with the cold plate. On the contrary, injection of saline or gabapentin did not modify locomotion compared to mice that had no injections. They spent the same amount of time on each plate when both at room

temperature contrary to the amitriptyline group: Saline,  $49\% \pm 2$ ; amitriptyline,  $31\% \pm 11$ ; gabapentin,  $49\% \pm 2$ .

When tested on the cold plate, animals that received gabapentin spent significantly more time on the cold plate compared to the control group (Fig. 5B).

We have shown that the double plate technique used to assess cold allodynia in neuropathic mice is adequate and offers advantages over the other techniques.

After surgery, all operated mice displayed clear hypersensitivity to cold with either the acetone or the double plate technique. The CCI model was the most sensitive model in both tests, which is consistent with other studies using the acetone technique [7] and the cold plate [7, 11]. What the single cold plate at  $5^{\circ}\text{C}$  measures, allodynia or hyperalgesia, is still not clear even in the recent literature [15, 20]. The cold plate was also used to evaluate cold stressed exacerbated ongoing pain and not cold allodynia because discrepancies were observed between the results with acetone and the  $5^{\circ}\text{C}$  cold plate [4, 11]. A recent study calculated the latency of brisk withdrawal of the rat paws placed on a plate set at a temperature of  $5^{\circ}\text{C}$  or higher [1]. However, a simple cold plate even regulated at a higher temperature would not prevent the phenomenon of cold stressed exacerbated allodynia. In addition, the latency of brisk withdrawal of the paw can be altered by drugs that produce sedative effects or motor impairments hardly detectable on a simple plate. The use of acetone with mice could also lead to a problem of misinterpretation. Indeed, we observed that control animals, and even naive mice, always responded positively to acetone by lifting shaking and licking their paw, as reported in other studies [12, 18]. This response could be due to a combination of cold allodynia, chemical and/or mechanical stimulations [7]. Since naive mice should not display cold allodynia, two reasons might explain these positive basal responses: (1) mice have a natural aversion to acetone due to its chemical properties, i.e. irritation or odor [3]; (2) the cold stimulus induced by acetone is painful for naive mice. Despite the fact that acetone certainly reflects cold hypersensitivity in mice, since we

observed a correlation between acetone and the double plate techniques, the acetone stimulus seems too strong for mice when studying allodynia.

On the contrary, in the double plate, the cold stimulus is at 18°C, a non-noxious temperature, really reflecting cold allodynia. In addition, we did not record the number of paw lifts but rather the time that the animal had its operated paw on the cold plate, which excluded the possibility of recording ongoing pain. Moreover, cold exacerbated ongoing pain was not present because mice could easily escape to a thermoneutral place as confirmed by the fact that the time spent on the cold plate is correlated with its temperature. Hence, the observed behavior is due to the sensitivity of mice to cold and not to a response to the stress induced by cold or surgery.

This double plate technique was pharmacologically validated by gabapentin a classical drug used against neuropathic pain. It alleviated cold allodynia without a complete loss of cold sensation. In the case of amitriptyline, the dose used induced sedative effects that were not compatible with testing using the double plate technique. Indeed, recording the number of time the mouse crossed the midline with both plates at room temperature showed clearly that the effects of amitriptyline reduced explorative behavior. Therefore, the double plate technique with this control made in the same environment would help to discriminate between the real analgesic effects and sedative effects or motor impairments due to drugs.

However, this technique has some limitations. Indeed, although the measurement is focused on the ipsilateral paw being in contact with the cold plate, we cannot compare the ipsi- and contralateral sides. The fact that mice applied - sometimes for a relatively long period- only their forepaws on the cold plate, makes this test probably a measurement of cold hypersensitivity of the injured limb. However, it is hard to evaluate the real sensitivity to cold of the forepaw with this method in order to ensure that the observed behavior does not impart an avoidance of cold from non-injured limbs. In addition, the observed behavior is integrated at higher levels and it is then impossible to measure reflex responses. Therefore, this corresponds better to the measurement of pain perception which has multifactorial components.

In conclusion, we have developed a new method for assessing cold allodynia in mice which produced results consistent with the acetone technique. This method has the advantage of not applying noxious stimuli, thus reflecting true allodynia and it is devoid of problems of interpretation that can occur with a simple plate or the use of acetone. The duration of testing does not seem to influence the observed behavior. Therefore, even 5 minutes testing could be enough at least for assessing CCI induced cold allodynia. In addition, mice can escape the nociceptive stimulus, corresponding to ethical IASP guidelines, which tend to minimize suffering of animals [22]. Furthermore, the paradigm of this technique can be applied with other temperatures to evaluate the implication of receptors that are sensitive to different levels of temperature.

## References

- [1] AJ Allchorne, DC Broom, CJ Woolf, Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats, *Mol. Pain* 1 (2005) 36.
- [2] GJ Bennett, YK Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain* 33 (1988) 87-107.
- [3] AF Bourquin, CJ Woolf, N Gilliard, DR Spahn, I Decosterd, Assessment of neuropathic pain behaviour: spared nerve injury model (SNI), 4<sup>th</sup> Congress of the European Federation of IASP Chapters, Prague (2003) abstract number 187-W.
- [4] Y Choi, YW Yoon, HS Na, SH Kim, JM Chung, Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain, *Pain* 59 (1994) 369-376.
- [5] I Decosterd, CJ Woolf, Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain, *Pain* 87 (2000) 149-158.
- [6] J De Vry, E Kuhl, P Franken-Kunkel, G Eckel, Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.* 491 (2004) 137-148.
- [7] T Dowdall, I Robinson, TF Meert, Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80 (2005) 93-108.
- [8] MJ Esser, J Sawynok, Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptoms and route effects, *Pain* 80 (1999) 643-653.
- [9] HA Hofmann, J De Vry, A Siegling, P Spreyer, D Denzer, Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain *Eur. J. Pharmacol.* 470 (2003) 17-25.
- [10] L Jasmin, L Kohan, M Franssen, G Janni, JR Goff, The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models, *Pain* 75 (1998) 367-382.
- [11] JK Kim, YW Yoon, JM Chung, Comparison of three rodent neuropathic pain models, *Exp. Brain Res.* 113 (1997) 200-206.
- [12] BH Lee, J Seong, UJ Kim, R Won, J Kim, Behavioral characteristics of a mouse model of cancer pain, *Yonsei Med. J.* 46 (2005) 252-259.



- [13] DD McKemy, How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation, *Mol. Pain* 1 (2005) 16.
- [14] DD McKemy, WM Neuhauser, D Julius, Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation, *Nature* 416 (2002) 52-58.
- [15] K Obata, H Katsura, T Mizushima, H Yamanaka, K Kobayashi, Y Dai, T Fukuoka, A Tokunaga, M Tominaga, K Noguchi, TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2393-2401.
- [16] AM Peier, A Moqrich, AC Hergarden, AJ Reeve, DA Andersson, GM Story, TJ Earley, I Dragoni, P McIntyre, S Bevan, A Patapoutian, A TRP channel that senses cold stimuli and menthol, *Cell* 108 (2002) 705-715.
- [17] Z Seltzer, R Dubner, Y Shir, A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury, *Pain* 43 (1990) 205-218.
- [18] SB Smith, SE Crager, JS Mogil, Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains, *Life Sci.* 74 (2004) 2593-2604.
- [19] M Tominaga, MJ Caterina, Thermosensation and pain, *J. Neurobiol.* 61 (2004) 3-12
- [20] KC Vissers, VL Hoffmann, HF Adriaensen, RJ Heylen, TF Meert, Increased cold allodynia following intrathecal N-methyl-D-aspartate in rats with a mononeuropathy, *Life Sci.* 77 (2005) 414-422.
- [21] JS Walczak, V Pichette, F Leblond, K Desbiens, P Beaulieu, Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: A new model of neuropathic pain, *Neuroscience* 132 (2005) 1093-1102.
- [22] M Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 16 (1983) 109-110.
- [23] M Zimmermann, Pathobiology of neuropathic pain, *Eur. J. Pharmacol.* 429 (2001) 23-37.

Figure 1

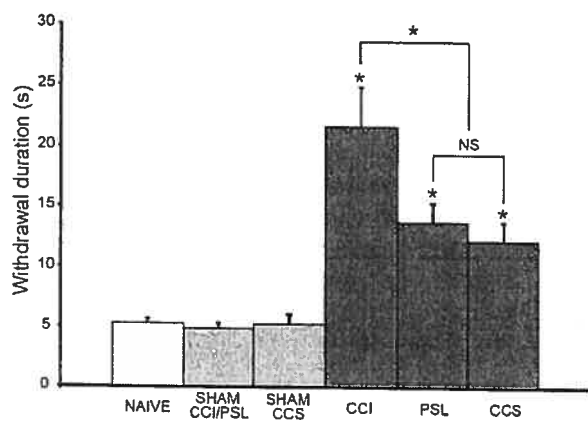


Figure 2

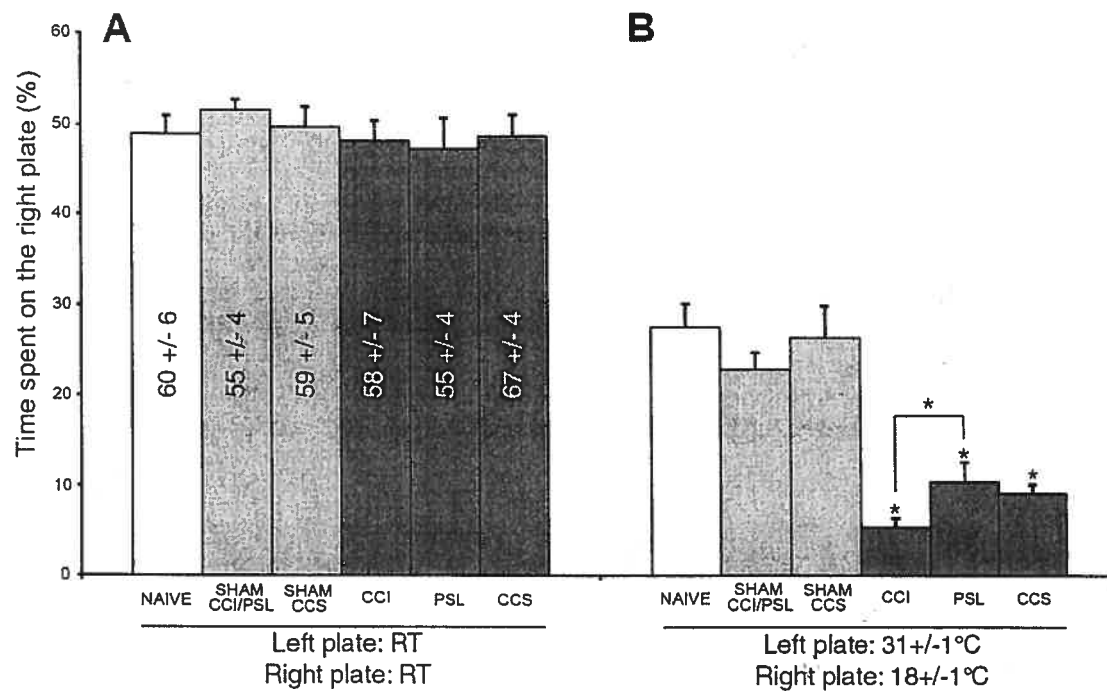


Figure 3

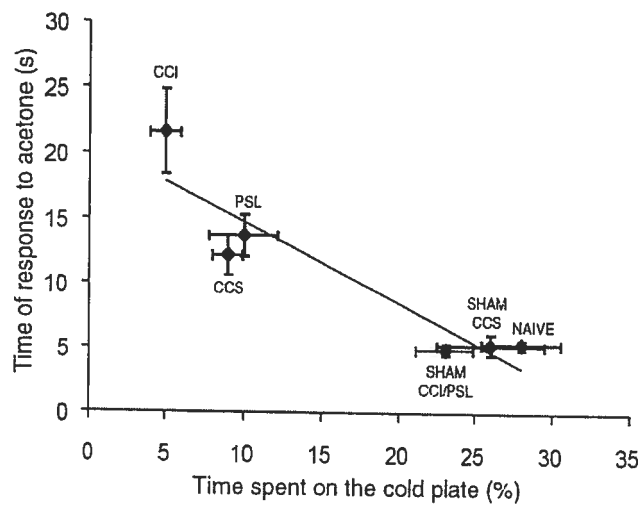


Figure 4

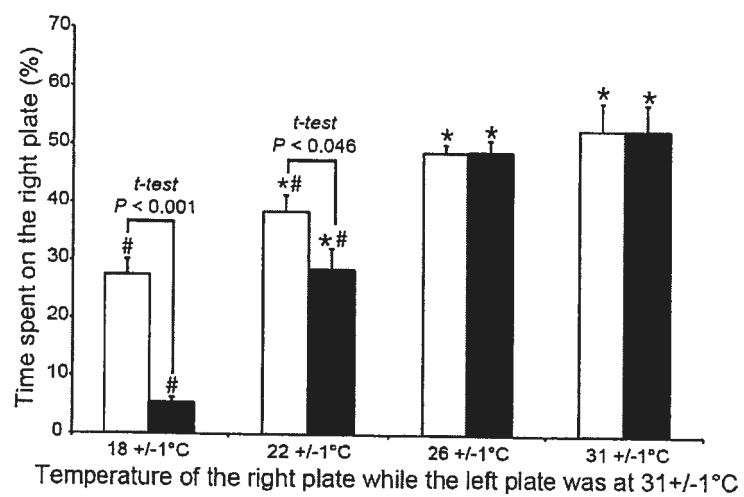
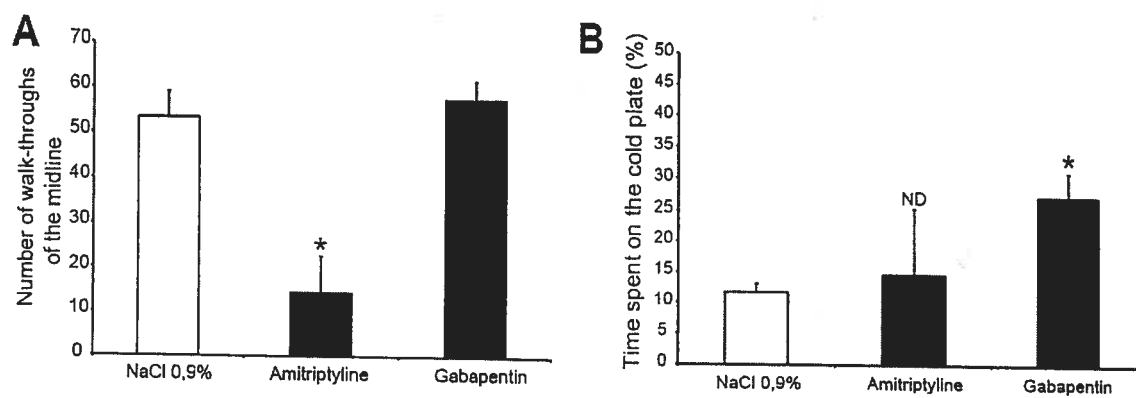


Figure 5



### Figure legends

**Fig. 1.** Assessment of cold sensitivity with the acetone drop technique on the ipsilateral paws of naive, sham, CCI, PSL and CCS neuropathic mice (n=8-12 per group). (\*)  $P < 0.05$  versus sham or naive groups; NS: non significant.

**Fig. 2.** Assessment of cold sensitivity with the double plate technique on naive, sham, CCI, PSL and CCS mice (n=8-12 per group). (A) Percentage of time spent on one side when both plates were at room temperature (RT: 22°C). Numbers in the bars are the number of walking-throughs the midline. (B) Percentage of time spent on the cold plate kept at 18°C. (\*)  $P < 0.05$  versus sham or naive groups.

**Fig. 3.** Response to acetone against time spent on the cold plate in naive, sham CCI/PSL, sham CCS, CCI, PSL and CCS mice showing the regression line ( $r = -0.93$ ).

**Fig. 4.** Assessment of cold sensitivity with the double plate technique on naive (white bars) and CCI (black bars) mice (n=8 per group) with variation of temperature of the cold plate, the other plate was constantly at thermoneutral temperature (31±1°C).  $P < 0.05$  was considered significant: (\*) versus 18±1°C, (#) versus 31±1°C.

**Fig. 5.** Pharmacological validation of the double plate technique on CCI mice (n=8 per group) with amitriptyline (10 mg/kg, i.p.) and gabapentin (50 mg/kg, i.p.) injected 45 min before testing. (A) Evaluation of drug effects on motricity with both plates at room temperature. (B) Evaluation of cold allodynia with the plates at 31 and 18±1°C. (\*)  $P < 0.05$ ; (ND) not determined.

**Fin des articles**



## **Discussion**

Nous avons montré qu'une lésion de type mécanique sur le nerf saphène entraîne les symptômes de douleur neuropathique que sont l'allodynie et l'hyperalgésie chez le rat et la souris sur une relativement longue période. Globalement, les quatre modalités testées (allodynie au froid –testée de deux façons différentes– et mécanique et hyperalgésie mécanique et thermique) sont présentes. L'allodynie et l'hyperalgésie ont été réduites ou supprimées par l'administration systémique de composés utilisés contre la douleur neuropathique de classes pharmacologiques différentes. Il est à noter que la lésion du nerf saphène entraîne une réorganisation moléculaire des systèmes biologiques (opioïdes et cannabinoïdes) contrôlant la douleur à différents niveaux du système nociceptif périphérique. Enfin, nous avons montré chez la souris que le modèle de lésion du nerf saphène est applicable au modèle électrophysiologique nerf saphène-peau et qu'il engendre des changements électrophysiologiques en périphérie. Nous allons aborder les divers aspects de ces résultats, d'une part, en comparant les résultats obtenus chez le rat et la souris, puis en comparant les résultats obtenus sur le nerf saphène par rapport aux autres modèles notamment ceux ciblant le nerf sciatique. Nous établirons l'implication des cannabinoïdes dans ce modèle et, enfin, nous évaluerons les perspectives de recherche qu'engendrent ces résultats.

## **4. Études comportementales**

### **4.1. Comparaison rats – souris**

Premièrement, il est nécessaire de rappeler que les chirurgies que nous avons pratiquées chez le rat et la souris diffèrent légèrement par le type de ligature effectuée. En effet, chez le rat nous avons procédé à une ligature partielle serrée du nerf saphène alors que chez la souris il s'agissait de trois ligatures lâches autour du nerf. Nous avons dû procéder à ce type de lésion chez la souris à cause du trop petit diamètre du nerf saphène chez cette espèce qui nous empêchait de passer convenablement le fil de ligature à travers le nerf. Plusieurs études comparant diverses chirurgies ont montré que des différences

comportementales pouvaient survenir au sein de la même espèce. Ces différences concernaient surtout la durée et la magnitude de l'allodynie et de l'hyperalgésie (Kim *et al.* 1997; Dowdall *et al.* 2005). Si ces études ont montré des différences entre les modèles, il faut noter que ces chirurgies impliquant une ligature étaient réalisées avec des types de fils différents, or le type de fil utilisé peut influencer la réponse de l'animal. Par exemple, le plus souvent, du « catgut » chromique est utilisé pour la chirurgie CCI, or ce type de matériel de suture résorbable d'origine organique est susceptible d'engendrer de la neuroinflammation (Robinson et Meert 2005). Afin de ne pas ajouter de biais entre nos deux modèles, la lésion du nerf saphène a été faite chez le rat et la souris avec le même type de fil : du nylon. Nous pouvons alors supposer avoir minimisé les facteurs de variabilité pouvant survenir entre nos modèles chez le rat et la souris. En outre, le nylon n'est pas résorbable ce qui aurait peut-être pour incidence de léser le nerf sur une période plus longue.

Nous avons effectué une lésion du nerf saphène chez le rat et la souris. Celle-ci a entraîné l'apparition d'allodynie au froid et mécanique et d'hyperalgésie mécanique et thermique dans les deux espèces. Globalement, les résultats sont donc similaires. On observe néanmoins quelques différences dans l'apparition des symptômes de douleur neuropathique entre le rat et la souris. En effet, alors que chez le rat il est préférable d'attendre cinq à sept jours pour voir apparaître les quatre modalités d'allodynie et d'hyperalgésie, leur apparition est plus rapide chez la souris puisque dès le lendemain de la chirurgie, les animaux présentent ces symptômes de façon marquée. En outre, concernant l'hyperalgésie mécanique, celle-ci semble plus marquée chez la souris, mais il faut rappeler que la méthode d'évaluation n'est pas tout à fait identique. Alors que la piqûre d'épingle a été utilisée chez le rat, nous avons utilisé un filament de Von Frey supraliminaire chez la souris et compté la fréquence de retrait de la patte. En effet, face à la piqûre d'épingle, les souris, en raison de leur taille, ne peuvent appliquer suffisamment de poids sur leur patte pour que la stimulation par une épingle émoussée puisse produire un effet de piqûre. Les souris réagissaient alors systématiquement par un bref retrait de la patte. Ainsi, la meilleure

façon d'évaluer leur réponse était de calculer la fréquence de retrait de la patte qui ne pouvait se faire correctement qu'à l'aide d'une pression calibrée représentée par un filament de Von Frey supraliminaire. Cette technique a également été utilisée chez le rat pour révéler l'hyperalgésie (Fu *et al.* 2004).

## 4.2. Comparaison avec le nerf sciatique

D'un point de vue chirurgical, parmi les quatre modèles les plus répandus (CCI : *Chronic constriction injury*, PSL : *Partial sciatic nerve ligation*, SNL : *Spinal nerve ligation* et SNI : *Spared nerve injury*), notre modèle effectué chez le rat correspond au modèle PSL et celui chez la souris au modèle CCI mais appliqué au nerf saphène.

Ces quatre modèles présentent des changements de seuils de perception rapidement après la chirurgie, souvent dès le test subséquent à la chirurgie (dès une heure dans le cas du modèle PSL) (Bennett et Xie 1988; Seltzer *et al.* 1990; Kim et Chung 1992; Decosterd et Woolf 2000). En outre, ces symptômes durent plus d'un mois après la chirurgie. Ainsi, concernant l'apparition des premiers signes d'allodynie et/ou d'hyperalgésie et la durée de ces symptômes, nos résultats sont semblables à ces études. Dans le modèle décrit par Wallace et ses collaborateurs, suite à l'application d'un agent démyélinisant, l'allodynie et l'hyperalgésie thermique ne sont apparues qu'après une semaine suivant le traitement par la lysolécithine, et ce, qu'il s'agisse du nerf sciatique ou du nerf saphène (Wallace *et al.* 2003). Dans ce cas, il est probable que cette latence soit due au fait que l'agent démyélinisant doive agir un certain laps de temps, contrairement à une lésion mécanique, avant que le nerf soit suffisamment lésé pour que les premiers symptômes apparaissent. De même, dans ce modèle, les signes d'allodynie et d'hyperalgésie s'estompent environ 17 jours après le traitement ce qui peut s'expliquer par le fait que la myéline a pu se reconstituer entre temps. Au contraire, dans les modèles par lésion mécanique, le matériel de ligature reste en place provoquant des changements plus durables. Il est cependant

notable qu'au cours de cette étude, une même lésion n'avait entraîné que peu de différences comportementales entre le nerf sciatique ou le nerf saphène.

Chez le rat, une étude a comparé divers modèles ciblant le nerf sciatique (les modèles CCI, PSL, SNL et des modèles de transection) avec les mêmes types de tests comportementaux que notre étude chez le rat, excepté pour le test d'hyperalgésie thermique réalisé sur une plaque chaude. Cette étude a révélé que toutes ces chirurgies induisaient une augmentation claire de la sensibilité à la piqûre d'épingle (Dowdall *et al.* 2005), contrairement à ce que nous avons observé chez le rat suite à la lésion du nerf saphène. Ainsi, il pourrait s'agir ici d'une propriété spécifique du nerf saphène.

Chez la souris, plusieurs études ont adapté les modèles développés chez le rat. Le modèle CCI a été testé pour l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique (Sommer *et al.* 1997). Dans cette étude les modalités ont été testées entre le troisième et le huitième jour après la chirurgie. Il semble que l'allodynie et l'hyperalgésie apparaissent également rapidement (dès le troisième jour après la chirurgie). Le modèle PSL a été évalué pour l'allodynie mécanique et au froid ainsi que l'hyperalgésie mécanique et thermique dans deux études caractérisant la sensibilité de souris dont les gènes encodant les récepteur CB<sub>1</sub> ou NK1 ont été invalidés. Dans la première étude, les souris témoins présentaient de l'allodynie au froid et mécanique et de l'hyperalgésie thermique dès le premier jour après la chirurgie et ce au moins pendant 15 jours, moment où l'étude a été arrêtée (Castane *et al.* 2006). Ces résultats correspondent à notre étude effectuée chez la souris. Dans la seconde étude, il n'a été malheureusement effectué que des mesures à un point donné après la chirurgie, mais les animaux présentaient de l'allodynie et de l'hyperalgésie mécanique ainsi que de l'allodynie au froid (Martinez-Caro et Laird 2000). Ceci montre que les études réalisées chez la souris neuropathique sur le nerf sciatique ont été faites sans un développement caractérisant clairement l'apparition et la durée de l'allodynie et de l'hyperalgésie. Néanmoins, notre étude montre qu'une lésion du nerf saphène chez la souris correspond à ce qui est décrit concernant une lésion du nerf sciatique chez la souris.

Également chez la souris, nous avons pu comparer l'allodynie au froid suite à la constriction chronique du nerf saphène avec deux modèles ciblant le nerf sciatique (CCI et PSL). Nous avons montré par deux types de mesures d'allodynie au froid que, concernant cette modalité, la constriction du nerf saphène entraîne un niveau d'allodynie au froid comparable à celui du modèle PSL. En revanche, le modèle CCI présente une sensibilité au froid supérieure aux deux autres modèles. Ces résultats concordent avec des études précédentes effectuées chez le rat et comparant divers modèles de douleurs neuropathique (Kim *et al.* 1997; Dowdall *et al.* 2005). Dans notre cas, nous avons utilisé le même matériel pour les ligatures (du nylon) dans chaque modèle et le modèle CCI est le plus proche du modèle de constriction chronique du nerf saphène. Ainsi, la différence d'allodynie au froid observée entre ces deux modèles provient certainement des différences entre le nerf sciatique et le nerf saphène. Il pourrait s'agir du fait que le nerf sciatique étant plus gros que le nerf saphène, plus de fibres ont été lésées. Il se pourrait également que les fibres motrices du nerf sciatique participent à cette augmentation d'allodynie au froid dans ce type de lésion par constriction chronique chez la souris.

#### **4.3. Cas de la mesure de l'allodynie au froid chez la souris**

Nous avons développé une technique permettant d'évaluer l'allodynie au froid chez la souris en utilisant un paradigme de préférence de place entre une plaque thermoneutre et une plaque froide. Les animaux qui présentent de l'allodynie au froid passent moins de temps que leurs témoins sur la plaque froide. Cette méthode est une bonne alternative aux autres couramment utilisées. En effet, au cours de nos études portant sur les modèles murins de douleur neuropathique, nous nous sommes aperçus que les techniques classiques de mesures d'allodynie au froid chez la souris pouvaient poser quelques problèmes d'interprétation. Ainsi, une plaque froide simple (généralement à une température de 4-5°C) doit être considérée comme un stimulus nociceptif puisque le seuil de nociception au froid est de 15°C (Tominaga et Caterina 2004; McKemy 2005). En outre, sur une simple

plaque, la mesure de sensibilité au froid est effectuée par le nombre ou la durée de secousses de la patte, or ce comportement peut survenir lors de douleur spontanée. Même plus, il peut apparaître sur une simple plaque froide de la douleur spontanée exacerbée par le stress dû au froid (Choi *et al.* 1994; Kim *et al.* 1997). On se rend ainsi aisément compte de la complexité d'interprétation avec la plaque froide si on souhaite évaluer précisément l'allodynie au froid. Concernant l'application d'acétone, plusieurs études dont la nôtre ont révélé que les souris témoins, même naïves, répondaient de façon systématique à une application d'acétone (Smith *et al.* 2004, b; Lee *et al.* 2005). Sachant que la stimulation par de l'acétone peut représenter un mélange de stimulation chimique (due aux propriétés de l'acétone), mécanique (due à l'application de la goutte sur la face plantaire) et enfin froide (par l'évaporation de l'acétone), il est difficile de savoir à quoi réagissent les souris lorsqu'elles sont stimulées par de l'acétone. Notre étude a révélé que le temps passé sur la plaque froide était corrélé avec le temps de réponse suite à l'application d'acétone. Ainsi, la stimulation par l'acétone reflète certainement une hypersensibilité au froid, mais si c'est bien le cas chez les souris naïves, alors il s'agit d'un stimulus douloureux qui ne peut donc pas être considéré comme une mesure d'allodynie. Si les souris naïves ne répondent pas au froid, alors il peut s'agir d'une réponse due aux propriétés chimiques de l'acétone (irritation ou odeur ?), ce qui dans ce cas perturbe l'interprétation des résultats chez les souris neuropathiques. La technique que nous avons développée permet d'observer chez les animaux un comportement intégré face au froid. Ce type de mesure de comportement douloureux correspond mieux à ce qui est mesuré chez les patients avec par exemple l'échelle visuelle analogue ou le *McGill Pain Questionnaire* qui tiennent compte des multiples dimensions de la douleur (Jensen *et al.* 2001). *A contrario*, les tests de nociception classiques chez les animaux peuvent refléter uniquement des réponses réflexes, celles-ci étant d'ailleurs modulées par les structures supraspinales. Un test plus intégré de préférence de place permet donc une meilleure évaluation du potentiel analgésique des médicaments. Ainsi, dans notre étude chez la souris utilisant l'acétone, nous avons observé une analgésie contre l'allodynie au froid de l'amitriptyline, mais les souris traitées à la

même dose et placées sur la plaque froide montraient un comportement exploratoire anormal certainement dû à un effet sédatif de l'amitriptyline. Cela montre que, même si le potentiel analgésique de l'amitriptyline n'est pas remis en cause, son interprétation reste difficile lorsque les effets sédatifs ou moteurs d'un médicament interviennent sur le comportement douloureux observé. Dans le cas du test de la double plaque par préférence de place, nous avons pu exclure l'amitriptyline étant donné qu'il était visible qu'elle ne possédait pas uniquement un effet analgésique.

Sachant que de nombreux patients atteints de douleur neuropathique présentent de l'allodynie et de l'hyperalgésie au froid (Jorum *et al.* 2003), il est nécessaire de mieux faire la distinction entre les deux symptômes lors des études animales. En outre, la découverte récente de récepteurs de la famille des TRP (*Transient Receptor Potential*) participant à la perception du froid (TRPM8 pour une température inférieure à 28°C et TRPA1 pour une température inférieure à 17°C) (McKemy 2005) augmente la pertinence d'utiliser des souris puisqu'elles peuvent être modifiées génétiquement. Pour toutes ces raisons, la méthode de la double plaque par préférence de place permet de mieux comprendre les mécanismes de l'allodynie au froid induite par la douleur neuropathique. Elle permet également de trouver des traitements pharmacologiques mieux appropriés.

## 5. Études pharmacologiques

Nous avons injecté chez le rat et la souris les mêmes doses rapportées au poids de quatre composés de classes pharmacologiques différentes reconnues comme ayant un rôle analgésique dans la douleur neuropathique : morphine, gabapentine, amitriptyline et un cannabinoïde, le WIN 55, 212-2. Nous allons discuter des résultats en considérant d'une part, la comparaison entre les deux espèces, et d'autre part, la comparaison avec les modèles ciblant le nerf sciatique.

## 5.1. Morphine

### 5.1.1. Comparaison rat – souris

Lors des tests, le comportement des rats et des souris neuropathiques après l'injection de morphine a été sensiblement le même. En effet, la morphine a réduit significativement l'allodynie au froid et mécanique mais n'a pas amélioré de façon statistiquement significative l'hyperalgésie thermique dans les deux espèces. Concernant l'hyperalgésie mécanique, la morphine s'est révélée efficace chez la souris, mais pas chez le rat de façon statistiquement significative. Il faut noter cependant que la faible amplitude d'hyperalgésie mécanique observée chez le rat à l'aide de la méthode par piqure d'épingle et la grande variabilité de ce test n'ont pas favorisé l'observation d'effet antihyperalgésique de la morphine (et des autres composés testés) pour cette modalité.

### 5.1.2. Comparaison avec le nerf sciatique

Plusieurs études effectuées suite à une lésion du nerf sciatique ont montré que la morphine se révélait efficace pour supprimer l'allodynie et l'hyperalgésie. Dans le modèle CCI, la morphine administrée de façon systémique a réduit l'allodynie mécanique et au froid et l'hyperalgésie mécanique à des doses allant de 0.625 à 10 mg/kg administrées de façon sous-cutanée (s.c.) (Pelissier *et al.* 2003; Blackburn-Munro *et al.* 2004; Pedersen et Blackburn-Munro 2006). Dans le modèle SNL, une dose de 3 mg/kg administrée par voie intra-veineuse a supprimé l'allodynie mécanique (Martin *et al.* 1998). De même, l'allodynie mécanique induite par la ligature du nerf spinal L5 a été quasiment abolie par l'administration sous-cutanée de 1, 3 et 6 mg/kg de morphine (LaBuda et Little 2005). Dans le modèle SNI, une dose de 6 mg/kg (s.c.) a supprimé l'allodynie mécanique, au froid et l'hyperalgésie mécanique (Erichsen et Blackburn-Munro 2002; Erichsen *et al.* 2005). Toujours dans les modèles de lésions de branches du nerf sciatique, la lésion du nerf tibial a induit de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie thermique (Hofmann *et al.* 2003). Dans



cette étude, seule l'allodynie mécanique a été testée pharmacologiquement. Elle a été supprimée par une administration intra-péritonéale de morphine à 8 mg/kg. Une étude comparant divers modèles de douleur neuropathique (CCI, SNI et DNI pour *Distal nerve injury*) a montré que la dose efficace 50 (DE<sub>50</sub>) de la morphine pour supprimer l'allodynie au froid et mécanique était globalement pour tous les modèles de 2 mg/kg une heure après une injection sous-cutanée (Hama et Borsook 2005).

Ces résultats correspondent avec ce que nous avons observé au niveau du nerf saphène notamment concernant les stimulations mécaniques et au froid. En revanche, on trouve très peu d'études montrant une efficacité de la morphine contre l'hyperalgésie thermique. Dans un modèle de névrite du nerf sciatique entraînant de la douleur neuropathique, la morphine (10 mg/kg) a eu un effet sur l'hyperalgésie thermique (Eliav *et al.* 1999). La même dose élevée a supprimé l'hyperalgésie thermique chez la souris neuropathique (Rashid *et al.* 2004). Dans le modèle SNL, l'administration de morphine, mais de façon intrathécale, a eu un effet contre l'hyperalgésie thermique (Wegert *et al.* 1997). Enfin, chez la souris, un traitement préventif avec la morphine (3-10 mg/kg, s.c.) supprime l'hyperalgésie thermique (Rashid et Ueda 2005). On voit ainsi que peu d'études démontrent clairement un effet de la morphine contre l'hyperalgésie thermique induite par une lésion nerveuse périphérique. Ces résultats concordent avec nos expériences et également avec le fait que le pouvoir analgésique de la morphine est diminué contre l'hyperalgésie thermique induite par la douleur neuropathique (Ohsawa *et al.* 2000; De Vry *et al.* 2004, b; Rashid *et al.* 2004).

## 5.2. Gabapentine

### 5.2.1. Comparaison rat – souris

Alors que chez le rat, seulement l'allodynie mécanique et au froid étaient diminuées par la gabapentine, chez la souris, les quatre modalités testées ont montré un effet anti-

allodynie et anti-hyperalgésique de la gabapentine. Si l'on exclut de cette comparaison les résultats obtenus chez le rat avec la piqure d'épingle pour les raisons que nous avons déjà mentionnées, alors la différence entre le rat et la souris provient surtout de l'hyperalgésie thermique. Plusieurs études chez le rat ont montré une certaine diversité dans l'effet antihyperalgésique. Alors qu'une dose de 50 mg/kg injectée par voie intrapéritonéale (i.p.) diminue légèrement l'hyperalgésie thermique chez le rat, une dose de 100 mg/kg (i.p.) ne provoque plus cet effet (De Vry *et al.* 2004, b). Dans d'autres modalités, 50 et 100 mg/kg i.p. ont le même effet contre l'allodynie et l'hyperalgésie mécanique (Pedersen et Blackburn-Munro 2006) ainsi que des doses de 30, 60 et 120 mg/kg (LaBuda et Little 2005). Malgré tout, il semble qu'une dose de 100 mg/kg soit plus efficace que des doses plus faibles (Erichsen et Blackburn-Munro 2002; Fox *et al.* 2003; Back *et al.* 2004; Hama et Borsook 2005; Urban *et al.* 2005). En revanche, une étude effectuée chez la souris a montré qu'une dose de 50 mg/kg supprimait efficacement l'allodynie et l'hyperalgésie notamment thermique (Castane *et al.* 2006). Ainsi, la différence que nous avons observée au niveau du nerf saphène pourrait s'expliquer par le fait que la dose de gabapentine requise contre l'hyperalgésie thermique est moins importante chez la souris que chez le rat.

### 5.2.2. Comparaison avec le nerf sciatique

Comme nous l'avons mentionné, chez le rat, la gabapentine est plus ou moins efficace selon le modèle de douleur neuropathique et la modalité testée. Ainsi, elle peut supprimer l'allodynie mécanique mais pas au froid ni l'hyperalgésie mécanique dans le modèle SNI (Erichsen et Blackburn-Munro 2002; Hama et Borsook 2005). Dans le cas du modèle CCI, la gabapentine n'améliore que partiellement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique (De Vry *et al.* 2004, b). Dans le modèle de lésion du nerf tibial, la gabapentine n'a pas d'effet anti-allodynie (Hofmann *et al.* 2003). En revanche, dans le modèle SNL, la gabapentine supprime l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique suite à une administration systémique ou par voie intrathécale (Cho *et al.* 2002; Urban *et al.* 2005). Une adaptation du modèle SNL par ligature du nerf spinal L5 a montré un effet anti-

allodynie de la gabapentine (LaBuda et Little 2005). Enfin dans le modèle PSL, la gabapentine supprime l'hyperalgésie mécanique, mais lorsqu'elle est administrée de façon répétée (Fox *et al.* 2003). Chez la souris, quelques études ont montré une efficacité de la gabapentine contre la douleur neuropathique dans divers modèles tels que le modèle d'ischémie induite au niveau du nerf sciatique (Gustafsson *et al.* 2003) et le modèle PSL (Tanabe *et al.* 2005; Castane *et al.* 2006). Ainsi, notre étude chez le rat a montré que la gabapentine n'était pas efficace dans toutes les modalités testées, ce qui correspond aux données de la littérature. Concernant notre étude chez la souris, elle est la première à montrer un effet anti-allodynie et anti-hyperalgésique de la gabapentine dans les quatre modalités testées.

### 5.3. Amitriptyline

#### 5.3.1. Comparaison rat – souris

Plusieurs différences ont été observées entre le rat et la souris suite à l'administration d'amitriptyline à 10 mg/kg i.p. En effet, alors que chez le rat cette dose n'a amélioré aucun symptôme de douleur neuropathique, l'amitriptyline injectée chez la souris a supprimé l'allodynie au froid et l'hyperalgésie thermique. Il faut cependant noter que lors du test de la double plaque, l'amitriptyline avait un effet sédatif suffisant pour réduire l'activité exploratoire de la souris. C'est probablement cet effet sédatif qui est la cause d'une diminution du temps de réponse à l'acétone au niveau de la patte controlatérale de la souris par rapport à des animaux témoins. Cet effet sédatif semble néanmoins ne pas perdurer puisque les valeurs controlatérales obtenues lors du test d'hyperalgésie thermique (effectué en dernier) étaient similaires à celles des témoins. Ainsi, chez la souris, cela démontre que l'amitriptyline a produit un effet analgésique et pas seulement sédatif. En outre, une grande différence est que chez les animaux naïfs, l'injection d'amitriptyline a sensibilisé les rats à une stimulation par de l'acétone alors que cela n'a pas été observé chez la souris. Aucune étude n'a révélé cette hypersensibilité à l'acétone suite à l'injection

d'amitriptyline. Cependant, il est possible qu'une modification au niveau du système sympathique provoque une hypersensibilité au froid (Lowe *et al.* 2005). En outre, une étude récente a démontré que des neurones du système sympathique possèdent des récepteurs au froid TRPA1 (Smith *et al.* 2004, a). Ainsi l'interaction de l'amitriptyline avec le système sympathique pourrait modifier la perception du froid bien que cela reste spéculatif. Une autre explication pourrait être que la stimulation par l'acétone comporte une fraction de stimulation mécanique. Or, nous avons observé chez le rat et la souris que l'amitriptyline provoquait une hypersensibilisation au stimulus mécanique. Ce phénomène d'hyperesthésie mécanique a déjà été observé dans la patte controlatérale d'animaux traités de façon aiguë ou chronique par de l'amitriptyline (Esser et Sawynok 1999; Esser *et al.* 2001). Cet effet a été exacerbé par l'administration de caféine, un antagoniste non spécifique des récepteurs à l'adénosine, montrant une implication de ce système dans l'hyperesthésie (Esser *et al.* 2001). L'adénosine étant un modulateur des terminaisons noradrénergiques sympathiques, il est possible que l'hyperesthésie induite par l'amitriptyline soit ainsi due à une modification du système sympathique. Des études sont toutefois à effectuer afin d'évaluer l'implication du système nerveux sympathique dans l'hyperesthésie induite par l'amitriptyline.

### **5.3.2. Comparaison avec le nerf sciatique**

Comme nous l'avons mentionné, d'autres études ont révélé de l'hyperesthésie suite à l'injection d'amitriptyline dans le modèle SNL en observant le côté controlatéral à la chirurgie. Si nous observons ce phénomène chez les animaux lésés au niveau du nerf saphène, ce qui concorde avec les résultats précédents, nous l'observons aussi chez des animaux naïfs. Ainsi, nos études montrent que l'hyperesthésie due à l'amitriptyline est proprement due au traitement et non à une combinaison de lésion neuropathique et d'amitriptyline.

Concernant l'effet analgésique de l'amitriptyline, nous avons seulement observé un effet chez la souris contre l'allodynie au froid et l'hyperalgésie thermique. Dans divers modèles ciblant le nerf sciatique, l'amitriptyline est le plus souvent rapportée comme étant efficace contre l'hyperalgésie thermique mais à des doses variant selon les études et les modèles : 10 mg/kg i.p. dans le modèle SNL (Esser et Sawynok 1999), 30 mg/kg i.p. (Bomholt *et al.* 2005) ou 32 et 128 mg/kg p.o. (De Vry *et al.* 2004, b) dans le modèle CCI. Comme dans notre étude chez le rat, l'allodynie au froid n'a pu être améliorée par l'amitriptyline (4,7 mg/kg i.v.) dans le modèle SNL (Wang *et al.* 1999). Enfin, concernant l'allodynie mécanique, très peu d'études ont montré un effet anti-allodynique, parfois très léger de l'amitriptyline (Abdi *et al.* 1998; Hofmann *et al.* 2003). Au contraire, de nombreuses études ont montré que l'allodynie mécanique n'était pas soulagée même par des doses parfois importantes d'amitriptyline (Esser et Sawynok 1999; Wang *et al.* 1999; De Vry *et al.* 2004, b; Bomholt *et al.* 2005). Chez la souris, une seule étude a évalué les effets de l'amitriptyline après une lésion mécanique du nerf sciatique (axotomie) (Yasuda *et al.* 2005). Cette étude a révélé que l'allodynie mécanique était soulagée suite à l'administration d'amitriptyline pour des doses allant de 25 à 100 mg/kg p.o.

Généralement, nos résultats obtenus avec le nerf saphène concordent avec ceux obtenus avec une lésion du nerf sciatique avec deux différences malgré tout. D'une part, l'hyperalgésie thermique n'est pas soulagée dans notre modèle chez le rat. D'autre part, chez la souris, l'allodynie mécanique produite par une lésion du nerf sciatique a été supprimée contrairement à notre modèle. Dans ce dernier cas, cependant, le petit nombre d'étude évaluant le potentiel analgésique de l'amitriptyline chez la souris neuropathique ne permet pas de conclure avec précision. Notre étude effectuée chez la souris est la première à évaluer le potentiel anti-allodynique et anti-hyperalgésique de l'amitriptyline dans les quatre modalités.

## 5.4. Cannabinoïde WIN 55, 212-2

### 5.4.1. Comparaison rat – souris

Le WIN 55, 212-2 a été le seul composé qui a supprimé l'allodynie et l'hyperalgésie dans toutes les modalités testées à la fois chez le rat et la souris (toujours en excluant le test à la piqûre d'épingle qui n'a pas pu montrer d'amélioration statistiquement significative chez le rat). Cependant, la différence essentielle observée entre les deux espèces provient du solvant du WIN 55,212-2 : une solution saline à 0.9% avec 40% de DMSO (diméthylsulfoxyde). En effet, alors que chez le rat, l'administration du solvant seul n'a pas modifié les seuils de sensibilité, chez la souris on a observé un effet analgésique et/ou sédatif. En effet, le DMSO n'est pas dépourvu d'activité biologique ce qui est susceptible de perturber les tests de nociception. Ainsi, le DMSO peut réduire la vitesse de conduction nerveuse (Cavaletti *et al.* 2000). De plus, le DMSO peut produire de l'hypolocomotion (Castro *et al.* 1995) et il possède même des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires faisant de lui un traitement d'appoint contre la cystite intersticielle (Sant et LaRock 1994; Castroman et Ness 2002). Si ces effets n'ont pas été remarqués chez le rat par rapport à la souris c'est que peut-être le volume d'injection était nettement plus petit chez le rat (2 mL/kg, par rapport à 15 mL/kg). Ainsi les effets obtenus chez les souris pourraient s'expliquer par le fait que, par rapport à leur poids, elles ont reçu une quantité plus importante (7,5 fois plus) de DMSO que les rats. Néanmoins, dans notre étude, les effets combinés du WIN 55, 212-2 avec son solvant sont plus importants que ceux du solvant seul. Il est cependant évident que des études avec d'autres solvants doivent être réalisées afin de mieux évaluer l'action anti-allodynique et anti-hyperalgésique du WIN 55, 212-2 chez la souris. Il existe très peu d'études évaluant l'activité de ce composé chez des souris neuropathiques. Au cours d'une étude chez des souris atteintes de neuropathie diabétique, le WIN 55, 212-2 a été administré à des doses de 1, 5 et 10 mg/kg i.p. et dissous dans 50% de DMSO. Les auteurs n'ont pas rapporté d'effets sédatifs ou hypolocomoteurs mais le

volume d'injection n'est pas mentionné (Dogrul *et al.* 2004). Des alternatives au DMSO devraient être étudiées afin de supprimer ce biais. Il existe en effet plusieurs autres solvants susceptibles d'être utilisés pour le WIN 55, 212-2 tels que l'éthanol ou des solvants lipidiques. Une étude comparant divers solvants a révélé qu'un solvant de type lipidique, l'émulphor 620 ne modifiait pas le comportement locomoteur des souris contrairement au DMSO ou à l'éthanol (Castro *et al.* 1995).

#### **5.4.2. Comparaison avec le nerf sciatique**

Comme de nombreux autres cannabinoïdes, le composé WIN 55, 212-2 s'est révélé efficace dans plusieurs modèles de douleur neuropathique ciblant le nerf sciatique. Ainsi, dans le modèle CCI, une injection de WIN 55, 212-2 a supprimé l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique que ce soit par voie intrathécale (Lim *et al.* 2003) ou intrapéritonéale (Herzberg *et al.* 1997). En outre, dans le même modèle de douleur neuropathique, une injection répétée à faible dose (0,1 mg/kg/jour s.c.) a supprimé l'hyperalgésie mécanique et thermique (Costa *et al.* 2004, b). Dans le modèle SNL, le WIN 55, 212-2 a supprimée l'allodynie au froid à une dose de 2,5 mg/kg i.p., l'hyperalgésie thermique à une dose de 0,5 mg/kg i.p. et enfin l'allodynie mécanique à une dose de 5 mg/kg i.p. (Bridges *et al.* 2001, a). Dans le même modèle une dose plus modeste (0,5 mg/kg i.p.) a réduit significativement l'allodynie mécanique et 2,5 mg/kg i.p. l'ont complètement abolie (LaBuda et Little 2005). Ces données correspondent avec celles que nous avons obtenues puisque le WIN 55, 212-2 s'est révélé efficace dans les quatre modalités que nous avons testées ainsi que dans les études précédentes.

### **5.5. Résumé des études pharmacologiques**

Concernant la comparaison de nos modèles ciblant le nerf saphène chez le rat et la souris, nous avons remarqué des différences suite à l'injection de gabapentine et d'amitriptyline. La gabapentine n'a été efficace chez le rat que contre l'allodynie au froid et

l'allodynie mécanique alors que chez la souris, toutes les modalités testées se trouvaient améliorées. Pour l'amitriptyline, alors qu'elle ne s'est révélée efficace dans aucune modalité chez le rat, elle a amélioré l'allodynie au froid et l'hyperalgésie thermique chez la souris. Il est à noter que chez les deux espèces, nous avons montré que l'amitriptyline induisait de l'hyperesthésie mécanique. Au sujet de la morphine et du cannabinoïde WIN 55, 212-2, les deux espèces ont globalement répondu de la même manière avec cependant un problème concernant le solvant du composé WIN 55, 212-2 chez la souris. Le WIN 55, 212-2 semble avoir donc le meilleur potentiel analgésique contre la douleur neuropathique chez le rongeur puisqu'il s'est révélé efficace dans quasiment toutes les modalités testées. Cependant, le WIN 55, 212-2 peut franchir la barrière hémato-encéphalique et par conséquent, étant donné qu'il est administré de façon systémique, il est possible que des effets centraux en plus des effets périphériques interviennent dans le comportement observé.

Nos résultats obtenus avec une lésion du nerf saphène correspondent à ce qui a été décrit dans la littérature sur le nerf sciatique avec toutefois une différence quant à l'efficacité de l'amitriptyline contre l'hyperalgésie thermique. Enfin, chez la souris, il existe un certain manque de données concernant les traitements que nous avons effectués empêchant de comparer avec exactitude les caractérisations pharmacologiques.

## **6. Implication des systèmes opioïde et cannabinoïde**

### **6.1. Expression des récepteurs**

Par immunobuvardage de type Western, nous avons montré qu'une lésion du nerf saphène entraînait une augmentation de l'expression des récepteurs  $\mu$  opioïde (MOR) ou des récepteurs cannabinoïdes CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>. Cette augmentation a été observée à la fois chez le rat et la souris et à divers endroits le long de la voie nociceptive afférente primaire : territoire cutané, ganglions rachidiens (effectué seulement chez le rat) et segments de la



moelle épinière concernés par le nerf saphène. Nous avons montré que l'augmentation de l'expression des récepteurs dans la moelle épinière se situait principalement du côté ipsilatéral chez le rat et la souris; nous n'avons pas déterminé les valeurs contralatérales dans les ganglions rachidiens et le territoire cutané chez le rat. Dans les deux études, l'augmentation de l'expression des récepteurs était présente à 1, 7 et 14 jours après la chirurgie. L'étude effectuée chez la souris a montré le pourcentage d'augmentation d'expression était équivalent à un et sept jours après la chirurgie. Les augmentations d'expression observées chez le rat et la souris sont comparables (entre 40 et 60 % d'augmentation), excepté pour le récepteur CB<sub>1</sub> (14 jours après la chirurgie chez le rat) et pour le récepteur MOR (un jour après la chirurgie au niveau cutané chez la souris) où les augmentations sont de l'ordre de 80 %.

L'expression de ces récepteurs n'explique donc pas les phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie obtenus chez les animaux neuropathiques puisqu'elle est augmentée. Une diminution ou une expression insuffisante des ligands endogènes pourrait expliquer les comportements observés. En effet, l'apport exogène d'agonistes de ces récepteurs permet, en partie, de réduire ou de supprimer l'allodynie et l'hyperalgésie, comme nous l'ont montré les études pharmacologiques.

## 6.2. Récepteur MOR

Nos résultats ont montré une augmentation de l'expression du récepteur MOR suite à une lésion du nerf saphène. Ces résultats sont en général contradictoires avec ceux décrits après une lésion du nerf sciatique. En effet, plusieurs études ont démontré une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur MOR dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière par RT-PCR chez la souris dans le modèle PSL (Pol *et al.* 2006) et par RT-PCR et hybridation *in situ* chez le rat dans les modèles SNL et SNI (Kohno *et al.* 2005). Cette dernière étude a montré par immunohistochimie que l'expression de la protéine était diminuée également à ces endroits. La diminution d'expression du récepteur MOR avait été

observée auparavant avec la même technique chez le rat et le singe suite à une axotomie (Zhang *et al.* 1998). Quant à nos observations, elles ont été effectuées à l'aide d'immunobuvardage de type Western. Cette technique a été utilisée chez des rats ayant subi le modèle CCI et a montré que l'expression du récepteur MOR augmente 14 jours après la chirurgie dans la portion distale du nerf sciatique (Truong *et al.* 2003), ce qui correspond à ce que nous avons obtenu dans les territoires cutanés. En outre, cette étude a non seulement démontré par immunohistochimie que l'expression du récepteur MOR était augmentée dans le site de lésion, mais également que le nombre de neurones exprimant le récepteur MOR était augmenté dans le ganglion rachidien L5. Il faut noter également que dans d'autres modèles de douleur neuropathique, l'expression du récepteur MOR n'a pas été modifiée. Ceci a été montré dans la moelle épinière dans un modèle de douleur neuropathique diabétique chez le rat (Chen et Pan 2003) et dans le modèle SNL chez la souris (Wang *et al.* 2001). Il existe donc une certaine variabilité selon les études et les modèles employés. Ainsi, nos observations peuvent provenir d'une propriété spécifique à la lésion du nerf saphène. Il se pourrait également que les différences que nous observons soient d'ordre technique. Il est en effet rapporté qu'une lésion nerveuse périphérique induit une augmentation de la phosphorylation du récepteur MOR dans la moelle épinière de souris ayant subi le modèle SNL (Narita *et al.* 2004). Cette phosphorylation participerait à l'internalisation des récepteurs MOR. Ainsi, il est possible que par immunobuvardage de type Western, nous détectons plus de récepteurs que par des techniques d'immunohistochimie. Il faut enfin souligner que l'augmentation d'expression du récepteur MOR correspond aux effets analgésiques observés avec la morphine dans plusieurs modèles dont les nôtres. Des études à l'aide de techniques variées nous aideront à mieux caractériser l'expression du récepteur MOR dans la douleur neuropathique induite par une lésion du nerf saphène.

### 6.3. Récepteurs cannabinoïdes

Très peu d'études ont évalué l'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> en condition neuropathique et plus particulièrement en périphérie. En effet, parmi les études existantes, seules les expressions de l'ARNm du récepteur CB<sub>1</sub> dans le thalamus (Siegling *et al.* 2001) et de la protéine dans la moelle épinière (Lim *et al.* 2003) ont été effectuées chez le rat suite à une lésion du nerf sciatique ou d'une de ses branches. Quant au récepteur CB<sub>2</sub>, une augmentation de l'expression de son ARNm avait été observée dans la moelle épinière dans les modèles CCI et SNL chez le rat (Zhang *et al.* 2003).

Nous avons montré chez le rat et la souris, qu'une lésion du nerf saphène induisait une réorganisation moléculaire quant à l'expression protéique des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> dans le territoire cutané, les ganglions rachidiens (étudiés chez le rat uniquement) ainsi que dans les segments spinaux d'où origine le nerf saphène. Depuis, l'étude de Wotherspoon et ses collaborateurs a confirmé nos données sur l'expression du récepteur CB<sub>2</sub>. Ils ont montré par immunohistochimie que la protéine du récepteur CB<sub>2</sub> était surexprimée dans la moelle épinière, le ganglion rachidien et les fibres du nerf sciatique en condition neuropathique (modèle SNL) (Wotherspoon *et al.* 2005).

Nos résultats obtenus dans la moelle épinière correspondent à ceux décrits dans la littérature pour les récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> (Lim *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003). En effet, en plus de l'augmentation de l'expression des récepteurs, ces études ont démontré par des techniques d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* que l'augmentation était principalement observée du côté ipsilatéral à la chirurgie. Nous avons pu vérifier ce phénomène chez la souris en utilisant l'immunobuvardage de type Western non seulement dans la moelle épinière mais également en périphérie. En outre, chez le rat, nous avons pu montrer que l'augmentation de l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> était due au moins en partie à une augmentation dans les neurones intrinsèques de la moelle épinière. En effet, l'augmentation d'expression du récepteur est supérieure dans la moelle épinière par rapport

aux ganglions rachidiens. Ce résultat concorde avec la localisation du récepteur CB<sub>1</sub> dans les neurones post-synaptiques de la moelle épinière et du faisceau dorso-latéral observée en condition normale chez le rat (Farquhar-Smith *et al.* 2000). Néanmoins, une augmentation de l'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> sur les terminaisons nerveuses des fibres afférentes primaires n'est pas à exclure suite aux résultats obtenus dans les ganglions rachidiens. Concernant le récepteur CB<sub>2</sub>, nous avons montré une augmentation d'expression de la protéine principalement du côté ipsilatéral de la moelle épinière ce qui confirme et complète les travaux de Zhang et ses collaborateurs. La comparaison des côtés controlatéraux des souris témoins et neuropathiques nous a montré que l'expression du récepteur CB<sub>2</sub> était légèrement augmentée également du côté controlatéral. Ce phénomène pourrait être expliqué par une migration des cellules microgliales. En effet, une fois activées, les cellules microgliales peuvent produire l'endocannabinoïde 2-AG capable d'activer la prolifération et la migration cellulaire via le récepteur CB<sub>2</sub> (Walter *et al.* 2003; Carrier *et al.* 2004). Il est possible que suite à la lésion du nerf saphène, la neuroinflammation produite par la lésion entraîne une activation des cellules microgliales du côté ipsilatéral qui vont ensuite proliférer et migrer, ce qui expliquerait l'augmentation du récepteur CB<sub>2</sub> que nous avons observée. Cela reste toutefois une hypothèse.

Il existe néanmoins une différence entre nos modèles et ce qui a été observé dans les modèles de douleurs neuropathiques. Dans notre modèle chez la souris, l'augmentation d'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> est sensiblement la même entre un et sept jours après la chirurgie. À l'inverse, l'expression du récepteur CB<sub>1</sub> augmente progressivement entre le premier et le 14<sup>ème</sup> jour dans le modèle CCI (Lim *et al.* 2003). Dans cette dernière étude, l'expression de l'ARNm du récepteur CB<sub>2</sub> est également augmentée progressivement entre le premier et le septième jour après la même chirurgie. Il peut s'agir d'une propriété spécifique du nerf saphène ou bien d'une variation entre les deux espèces puisque nous n'avons effectué des mesures de cinétique d'expression que chez la souris. En outre, il n'existe aucune donnée de cinétique d'expression sur le nerf sciatique chez la souris.

En résumé, nos résultats obtenus chez le rat et la souris concernant l'expression des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> en condition de douleur neuropathique sont conformes à ce qui avait été décrit précédemment dans la littérature. La principale différence réside dans la rapidité de l'augmentation d'expression, bien que nous ne puissions encore conclure s'il s'agit ou non d'une différence interspécifique. Nous avons démontré également pour la première fois une augmentation de l'expression des récepteurs cannabinoïdes en périphérie suite à une lésion nerveuse. Cette découverte est importante lorsqu'on sait qu'en clinique un traitement périphérique par des cannabinoïdes est souhaitable afin d'éviter les effets psychotropes des cannabinoïdes. Ceci est d'autant plus pertinent qu'il a été montré que des cannabinoïdes administrés localement dans la patte peuvent diminuer les symptômes de la douleur neuropathique (Fox *et al.* 2001; Guindon et Beaulieu 2006). De plus, l'activation du récepteur CB<sub>2</sub> peut supprimer la douleur neuropathique (Malan *et al.* 2003). Comme ce récepteur est principalement exprimé à la périphérie, l'augmentation de son expression montre qu'il demeure une cible pharmacologique importante afin de lutter contre la douleur neuropathique.

## 7. Réarrangements électrophysiologiques

Nous avons effectué des études électrophysiologiques uniquement chez la souris. À l'aide de la préparation électrophysiologique nerf saphène-peau (Reeh 1986), nous avons enregistré sur le nerf entier d'éventuelles décharges ectopiques. De plus, nous avons réalisé une cartographie de l'innervation fonctionnelle à différents temps après la lésion du nerf saphène afin de vérifier l'applicabilité de notre modèle dans des études des champs de perception cutanés. En effet, la préparation nerf saphène-peau permet d'étudier les potentiels d'action d'une fibre nerveuse isolée survenant suite à divers stimuli appliqués sur les territoires cutanés.

### 7.1. Cartographie de l'innervation fonctionnelle

La cartographie effectuée chez les animaux naïfs représente l'innervation du nerf saphène sur la face dorsale de la patte arrière des souris. L'innervation fonctionnelle a été pratiquement supprimée le lendemain de la chirurgie alors qu'elle est réapparue 10 jours après la chirurgie. La dégénérescence Wallerienne peut survenir dès 24 à 48 heures après une axotomie (Koeppen 2004), et ce phénomène pourrait expliquer la quasi-absence d'innervation fonctionnelle un jour après la chirurgie. Les mesures effectuées 10 jours après correspondraient alors à une réinnervation comme cela a été observé sur le nerf sciatique (Devor *et al.* 1979). Cependant, nous n'avons effectué que des mesures électrophysiologiques. Il n'est pas impossible que l'innervation soit toujours présente le lendemain de la chirurgie mais que la ligature du nerf saphène empêche d'enregistrer les potentiels d'actions provenant de la stimulation mécanique effectuée sur le territoire cutané. Néanmoins, la dégénérescence Wallerienne a été observée dans le territoire cutané de façon anatomique chez des animaux avec une neuropathie induite par le laser (Chiang *et al.* 2005) et dans le modèle CCI (George *et al.* 2004). Finalement, le fait de pouvoir stimuler le territoire cutané 10 jours après la chirurgie montre que nos modèles de douleur neuropathique sur le nerf saphène sont compatibles avec la technique électrophysiologique nerf saphène-peau.

### 7.2. Décharges ectopiques

L'activité spontanée que nous avons mesurée dans les préparations d'animaux naïfs provient de la tension exercée sur la peau lorsqu'elle est fixée dans le bain. En réalité, ces décharges sont donc évoquées et représentent un artéfact dû à la préparation. Ainsi les résultats obtenus ne sont pas incompatibles avec le fait qu'en conditions normales les neurones afférents primaires ne présentent pratiquement pas d'activité spontanée. L'activité que nous avons enregistrée est due aux fibres à adaptation lente de type II, expliquant ainsi

le fait que cette activité soit mesurée pendant une relativement longue période (PW Reeh, communication personnelle).

Suite à la chirurgie, nous avons observé une diminution de l'activité enregistrée un jour après la chirurgie, alors qu'elle est pratiquement triplée 10 jours après la chirurgie. La diminution d'activité enregistrée un jour après la chirurgie peut s'expliquer aisément par le fait qu'il y a une forte réduction du territoire fonctionnel au niveau cutané. En conséquence, la tension de la peau dans le bain stimule moins de fibres à adaptation lente de type II provoquant de ce fait la diminution des décharges observée. En revanche, 10 jours après la chirurgie il y a une augmentation du nombre de décharges par rapport au témoin. Or à ce moment, le territoire cutané n'a pas une innervation fonctionnelle supérieure à celui d'animaux naïfs (l'innervation est même toujours inférieure, bien qu'elle ait augmenté par rapport au lendemain de la chirurgie). Ainsi, 10 jours après la chirurgie, les décharges supplémentaires mesurées correspondent à des décharges ectopiques. Ces décharges ectopiques sont évoquées mécaniquement par la tension de la peau. Ce résultat correspond à ce qui a déjà été observé au niveau du nerf saphène. En effet, suite à une axotomie de différents nerfs chez le rat, il a été montré que très peu de fibres du nerf saphène présentaient de l'activité spontanée alors qu'une grande majorité présentait de l'activité ectopique évoquée par un stimulus mécanique (Tal *et al.* 1999). Une autre étude réalisée sur des névromes de nerf saphène (sans territoire cutané) a montré que 10 jours après l'axotomie, aucune fibre ne présentait de l'activité spontanée alors que 54 % présentait de l'hypersensibilité mécanique (Roza *et al.* 2003). Néanmoins, il faut noter que dans cette même étude, il a été observé que 19 % des fibres présentaient de l'activité spontanée 22 jours après la chirurgie. Il serait donc intéressant d'étudier notre modèle sur de plus longues périodes après la chirurgie pour voir si l'activité ectopique est augmentée par le fait de décharges spontanées. Malgré tout, l'activité ectopique que nous avons mesurée peut provenir en partie du névrôme puisque notre électrode d'enregistrement était placée en amont de la lésion sur le nerf. Cependant, étant donné que l'activité mesurée semble principalement évoquée par la tension de la peau, les décharges ectopiques proviendraient

plus certainement des changements de propriétés des territoires cutanés ayant été réinnervés. En effet, les propriétés des potentiels d'action des fibres repoussant après une lésion nerveuse sont différentes de la normale (Mert *et al.* 2004). Il serait également intéressant de voir s'il n'y a pas de modification au niveau du territoire cutané dans la transduction du signal. Ceci pourrait être étudié en combinant nos modèles de douleur neuropathique avec la préparation électrophysiologique nerf saphène-peau.

L'activité que nous avons mesurée correspond à une activité des fibres A (principalement les fibres A $\beta$ ). En effet, en enregistrant le nerf entier, seuls les potentiels d'action provenant de ces fibres sont enregistrables dans la préparation (PW Reeh, communication personnelle). Ce résultat est particulièrement intéressant, car même si les fibres A $\beta$  sont normalement impliquées dans la perception du toucher non nociceptif, leur rôle est important dans l'hypersensibilité due à lésion nerveuse périphérique. Premièrement, une portion non négligeable de fibres A $\beta$  correspond à des nocicepteurs (Djoughri et Lawson 2004). Ensuite, il a été montré que les fibres myélinisées montraient de l'activité ectopique suite à une axotomie chez le rat (Tal *et al.* 1999). Enfin, suite à une lésion nerveuse périphérique, les terminaisons des fibres A $\beta$  vont innervier les couches superficielles de la moelle épinière (Woolf *et al.* 1992; Lekan *et al.* 1996) et des conductions éphaptiques surviennent au niveau du nerf entre différents types de fibres (Seltzer et Devor 1979; Amir et Devor 1992; Amir et Devor 2000). Ces phénomènes montrent bien l'importance des fibres A $\beta$  dans la production de l'allodynie puisque leur activation entraîne alors une stimulation des voies nociceptives. Ainsi, l'augmentation du nombre de décharges des fibres A que nous avons enregistrée pourrait en partie expliquer le comportement observé chez les souris neuropathiques. Il faut toutefois noter que dès le lendemain de la chirurgie, bien que les animaux présentaient de l'allodynie, le nombre de décharges enregistré était réduit. Une explication possible serait que les fibres C aient participé à l'hypersensibilité des animaux rapidement après la chirurgie, mais que nous ne pouvions les enregistrer sur le nerf entier. Il a en effet été montré que la réponse des fibres C était modifiée par une diminution de leurs seuils d'activation mécanique et thermique en condition neuropathique



(Shim *et al.* 2005). En outre, nous avons démontré que l'expression du proto-oncogène c-Fos était augmentée dans la corne dorsale de la moelle épinière du côté ipsilatéral. La mesure de l'expression de c-Fos à cet endroit est une indication de l'activité neuronale des fibres afférentes primaires de nature nociceptive (Chapman et Besson 1997). Comme l'expression de c-Fos était augmentée dès le lendemain de la chirurgie, il est fort probable qu'il y ait eu une augmentation de l'activité des fibres C. De futures études sur des fibres isolées à l'aide de la préparation nerf saphène-peau permettront de connaître mieux l'implication de chaque type de fibres dans les réarrangements électrophysiologiques qui surviennent en condition neuropathique.

## Conclusion - Perspectives

Nos études ont montré qu'une lésion du nerf saphène chez le rat ou la souris engendrait de la douleur neuropathique. Ainsi, les modèles ciblant le nerf saphène produisent de l'allodynie et de l'hyperalgésie qui sont sensibles à des composés de diverses classes pharmacologiques utilisés cliniquement contre la douleur neuropathique. De plus, nous avons montré que la lésion du nerf saphène provoquait une réorganisation moléculaire (expression du proto-oncogène c-Fos, des récepteurs MOR, CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>) et électrophysiologique (décharges ectopiques, modification de l'innervation fonctionnelle au niveau du territoire cutané).

Parmi les différents modèles existants, l'apport de ce modèle réside dans le fait qu'une lésion neuropathique est créée sur un nerf composé purement de fibres sensitives. En plus des avantages comportementaux qu'apporte le fait de ne pas léser de fibres motrices, ce modèle permet de comparer diverses propriétés observées avec le nerf sciatique qui contient lui des fibres motrices. Ainsi, des différences d'expressions de récepteurs, peptides et neurotransmetteurs au niveau spinal et des ganglions rachidiens ne sont pas à exclure. En outre, la possibilité d'utiliser des animaux transgéniques avec le modèle murin aidera à déterminer l'implication des produits de certains gènes dans les mécanismes de la douleur neuropathique. Enfin, le fait de pouvoir combiner un modèle de douleur neuropathique sur le nerf saphène avec la préparation électrophysiologique nerf saphène-peau permet de mieux comprendre certains mécanismes périphériques de la douleur neuropathique.

Concernant l'implication du système cannabinoïde, nous avons pour la première fois démontré une augmentation de l'expression protéique des récepteurs CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub> en condition neuropathique et ce, à diverses localisations dans le système nociceptif afférent primaire périphérique : territoire cutané et ganglion rachidien. Nous avons également démontré une augmentation de ces récepteurs du côté ipsilatéral de la moelle épinière confirmant ainsi les études précédentes. Les effets analgésiques des cannabinoïdes étant démontrés, ces résultats sont en faveur d'une utilisation clinique des cannabinoïdes contre

la douleur neuropathique. En effet, d'une part on observe une augmentation du récepteur CB<sub>1</sub> en périphérie, et d'autre part une augmentation du récepteur CB<sub>2</sub>. Ainsi, l'activation du récepteur CB<sub>2</sub> n'entraîne pas d'effet psychoactif puisqu'il est faiblement exprimé dans le système nerveux central par rapport au récepteur CB<sub>1</sub>. De plus, l'augmentation du récepteur CB<sub>1</sub> au niveau des territoires cutanés et des ganglions rachidiens montre que l'activation périphérique de ces récepteurs serait possible par application topique ou en utilisant des agonistes ne franchissant pas la barrière hématoencéphalique. L'activation périphérique du récepteur CB<sub>1</sub> permettrait là encore d'éviter les effets psycho actifs non désirés liés à l'utilisation des cannabinoïdes. La combinaison des modèles de douleur neuropathique ciblant le nerf saphène avec la technique électrophysiologique nerf-saphène peau permettra de mieux connaître les mécanismes d'action périphérique des cannabinoïdes en condition neuropathique.

Les perspectives de recherche découlant de nos travaux sont d'une part d'approfondir les connaissances quant à l'expression des récepteurs cannabinoïdes, d'autre part de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le système cannabinoïde intervient dans l'analgésie périphérique en condition neuropathique :

- Nous avons déterminé une augmentation de l'expression des récepteurs par immunobuvardage de type Western. Afin de connaître la localisation précise des sites d'augmentation des récepteurs, des techniques d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* permettraient de connaître les types cellulaires impliqués. Ce type d'étude serait particulièrement utile dans le territoire cutané puisque les tissus que nous avons prélevés étaient minoritairement nerveux. En outre, dans les ganglions rachidiens et la moelle épinière, cela permettrait de connaître les types de neurones ou de cellules gliales impliqués. Des techniques d'histo-autoradiographie à l'aide d'agonistes marqués permettraient également d'obtenir une localisation plus précise de l'augmentation des récepteurs ainsi qu'un éventuel changement d'affinité des récepteurs pour leurs ligands.

- A l'aide de la préparation nerf saphène-peau nous pourrions étudier précisément les mécanismes électrophysiologiques survenant aux champs de perception cutanés. Cette technique permet l'application de stimuli de nature mécanique ou thermique. Il est possible d'appliquer des stimuli chimiques ou de tester divers traitements pharmacologiques et ce, sur des fibres isolées. Il sera alors possible de mieux comprendre la réorganisation nerveuse survenant en périphérie dans le territoire cutané. La possibilité d'appliquer des cannabinoïdes sur les champs de perception cutanés de fibres isolées permettra de mieux comprendre l'implication du système cannabinoïde dans l'analgésie périphérique en condition de douleur neuropathique.

## Bibliographie

- Abdi S., Lee D.H., Chung J.M. (1998) The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 87:1360-1366
- Adams I.B., Compton D.R., Martin B.R. (1998) Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 284:1209-1217
- Ahluwalia J., Urban L., Bevan S., Capogna M., Nagy I. (2002) Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. *Neuroscience* 110:747-753
- Ahluwalia J., Urban L., Capogna M., Bevan S., Nagy I. (2000) Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 100:685-688
- Aley K.O., Levine J.D. (2002) Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 111:389-397
- Allchorne A.J., Broom D.C., Woolf C.J. (2005) Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain* 1:36
- Amir R., Devor M. (1992) Axonal cross-excitation in nerve-end neuromas: comparison of A- and C-fibers. *J Neurophysiol* 68:1160-1166
- Amir R., Devor M. (1996) Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 16:4733-4741
- Amir R., Devor M. (2000) Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 95:189-195
- Amir R., Kocsis J.D., Devor M. (2005) Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci* 25:2576-2585
- Andrew D., Greenspan J.D. (1999) Modality-specific hyper-responsivity of regenerated cat cutaneous nociceptors. *J Physiol* 516 (Pt 3):897-906
- Ashton C.H. (2001) Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 178:101-106
- Back S.K., Won S.Y., Hong S.K., Na H.S. (2004) Gabapentin relieves mechanical, warm and cold allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 368:341-344

- Banos J.E., Verdu E., Buti M., Navarro X. (1994) Effects of dizocilpine on autotomy behavior after nerve section in mice. *Brain Res* 636:107-110
- Basbaum A., Jessel T. (2000) The Perception of Pain. In: *Principles of neural science* (Kandel E, Schwartz J, Jessel T, eds), London: McGraw-Hill, pp 472-491
- Baskfield C.Y., Martin B.R., Wiley J.L. (2004) Differential effects of delta9-tetrahydrocannabinol and methanandamide in CB1 knockout and wild-type mice. *J Pharmacol Exp Ther* 309:86-91
- Benedetti F., Vighetti S., Amanzio M., Casadio C., Oliaro A., Bergamasco B., Maggi G. (1998) Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. *Pain* 74:205-211
- Bennett G.J., Xie Y.K. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107
- Besse D., Lombard M.C., Perrot S., Besson J.M. (1992) Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. *Neuroscience* 50:921-933
- Birch P.J., Dekker L.V., James I.F., Southan A., Cronk D. (2004) Strategies to identify ion channel modulators: current and novel approaches to target neuropathic pain. *Drug Discov Today* 9:410-418
- Blackburn-Munro G., Bomholt S.F., Erichsen H.K. (2004) Behavioural effects of the novel AMPA/GluR5 selective receptor antagonist NS1209 after systemic administration in animal models of experimental pain. *Neuropharmacology* 47:351-362
- Bomholt S.F., Mikkelsen J.D., Blackburn-Munro G. (2005) Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 48:252-263
- Bonhaus D.W., Chang L.K., Kwan J., Martin G.R. (1998) Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287:884-888
- Boulanger A. (2005) Approche et traitement de la douleur neuropathique. In: *Pharmacologie de la douleur* (Beaulieu P, ed), Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal, pp 405-437

- Brand M., Klusch A., Kurzai O., Valdeolmillos M., Schmidt R.F., Petersen M. (2001) No evidence for bradykinin B1 receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* 12:3165-3168
- Bridges D., Ahmad K., Rice A.S. (2001, a) The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 133:586-594
- Bridges D., Thompson S.W., Rice A.S. (2001, b) Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 87:12-26
- Bridges D., Rice A.S., Egertova M., Elphick M.R., Winter J., Michael G.J. (2003) Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience* 119:803-812
- Briscini L., Corradini L., Ongini E., Bertorelli R. (2002) Up-regulation of ORL-1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury. *Eur J Pharmacol* 447:59-65
- Cadogan A.K., Alexander S.P., Boyd E.A., Kendall D.A. (1997) Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem* 69:1131-1137
- Campos M.M., Ongali B., Thibault G., Neugebauer W., Couture R. (2005) Autoradiographic distribution and alterations of kinin B(2) receptors in the brain and spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Synapse* 58:184-192
- Carrier E.J., Kearn C.S., Barkmeier A.J., Breese N.M., Yang W., Nithipatikom K., Pfister S.L., Campbell W.B., Hillard C.J. (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65:999-1007
- Castane A., Celerier E., Martin M., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R., Valverde O. (2006) Development and expression of neuropathic pain in CB1 knockout mice. *Neuropharmacology* 50:111-122
- Castro C.A., Hogan J.B., Benson K.A., Shehata C.W., Landauer M.R. (1995) Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav* 50:521-526
- Castroman P.J., Ness T.J. (2002) Spinal neurophysiologic correlates of the analgesic actions of intravesical dimethyl sulfoxide and capsaicin in the rat. *J Pain* 3:394-400

- Cavaletti G., Oggioni N., Sala F., Pezzoni G., Cavalletti E., Marmiroli P., Petruccioli M.G., Frattola L., Tredici G. (2000) Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. *Toxicol Lett* 118:103-107
- Chapman V., Besson J.-M. (1997) Pharmacological studies of nociceptive systems using the c-Fos immunohistochemical technique: an indicator of noxiously activated spinal neurones. In: *The pharmacology of pain* (Dickenson A, Besson J-M, eds), Berlin: Springer, pp 235-279
- Chauvin M., Beaulieu P. (2005) Pharmacologie des opioïdes. In: *Pharmacologie de la douleur* (Beaulieu P, ed), Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal, pp 38-77
- Chen S.R., Pan H.L. (2003) Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats. *Anesthesiology* 99:1409-1414
- Chen Y., Devor M. (1998) Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis. *Eur J Pain* 2:165-178
- Chen Y., Li G.W., Wang C., Gu Y., Huang L.Y. (2005) Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state. *Pain* 119:38-48
- Chiang H.Y., Chen C.T., Chien H.F., Hsieh S.T. (2005) Skin denervation, neuropathology, and neuropathic pain in a laser-induced focal neuropathy. *Neurobiol Dis* 18:40-53
- Cho H.S., Kim M.H., Choi D.H., Lee J.I., Gwak M.S., Hahm T.S. (2002) The effect of intrathecal gabapentin on mechanical and thermal hyperalgesia in neuropathic rats induced by spinal nerve ligation. *J Korean Med Sci* 17:225-229
- Choi Y., Yoon Y.W., Na H.S., Kim S.H., Chung J.M. (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59:369-376
- Christoph T., Reissmuller E., Schiene K., Englberger W., Chizh B.A. (2005) Antiallodynic effects of NMDA glycine(B) antagonists in neuropathic pain: possible peripheral mechanisms. *Brain Res* 1048:218-227
- Coderre T.J., Kumar N., Lefebvre C.D., Yu J.S. (2005) Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem* 94:1131-1139



- Conti S., Costa B., Colleoni M., Parolaro D., Giagnoni G. (2002) Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135:181-187
- Corey S. (2005) Recent developments in the therapeutic potential of cannabinoids. *P R Health Sci J* 24:19-26
- Costa B., Colleoni M., Conti S., Parolaro D., Franke C., Trovato A.E., Giagnoni G. (2004, a) Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:294-299
- Costa B., Colleoni M., Conti S., Trovato A.E., Bianchi M., Sotgiu M.L., Giagnoni G. (2004, b) Repeated treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 reduces both hyperalgesia and production of pronociceptive mediators in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 141:4-8
- Coull J.A., Beggs S., Boudreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter M.W., De Koninck Y. (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021
- Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429:161-176
- Culshaw A.J., Bevan S., Christiansen M., Copp P., Davis A., Davis C., Dyson A., Dziadulewicz E.K., Edwards L., Eggelte H., Fox A., Gentry C., Groarke A., Hallett A., Hart T.W., Hughes G.A., Knights S., Kotsonis P., Lee W., Lyothier I., McBryde A., McIntyre P., Paloumbis G., Panesar M., Patel S., Seiler M.P., Yaqoob M., Zimmermann K. (2006) Identification and biological characterization of 6-aryl-7-isopropylquinazolinones as novel TRPV1 antagonists that are effective in models of chronic pain. *J Med Chem* 49:471-474
- De Vry J., Denzer D., Reissmueller E., Eijckenboom M., Heil M., Meier H., Mauler F. (2004, a) 3-[2-cyano-3-(trifluoromethyl)phenoxy]phenyl-4,4,4-trifluoro-1-butanedisulfonate (BAY 59-3074): a novel cannabinoid Cb1/Cb2 receptor partial agonist with antihyperalgesic and antiallodynic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 310:620-632
- De Vry J., Kuhl E., Franken-Kunkel P., Eckel G. (2004, b) Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 491:137-148

- Deadwyler S.A., Hampson R.E., Mu J., Whyte A., Childers S. (1995) Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 273:734-743
- Decosterd I., Woolf C.J. (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158
- Derkinderen P., Ledent C., Parmentier M., Girault J.A. (2001) Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem* 77:957-960
- Derkinderen P., Valjent E., Toutant M., Corvol J.C., Enslen H., Ledent C., Trzaskos J., Caboche J., Girault J.A. (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23:2371-2382
- Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949
- Devor M. (2006) Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 7 Suppl 1:S3-S12
- Devor M., Janig W., Michaelis M. (1994) Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol* 71:38-47
- Devor M., Schonfeld D., Seltzer Z., Wall P.D. (1979) Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 185:211-220
- Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771-784
- Di Marzo V., De Petrocellis L. (2006) Plant, Synthetic, and Endogenous Cannabinoids in Medicine. *Annu Rev Med* 57:553-574
- Dickenson A.H., Suzuki R. (2005) Opioids in neuropathic pain: clues from animal studies. *Eur J Pain* 9:113-116
- Djoughri L., Lawson S.N. (2004) Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46:131-145
- Dogrul A., Gul H., Yildiz O., Bilgin F., Guzeldemir M.E. (2004) Cannabinoids blocks tactile allodynia in diabetic mice without attenuation of its antinociceptive effect. *Neurosci Lett* 368:82-86

- Dowdall T., Robinson I., Meert T.F. (2005) Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80:93-108
- Eisenach J.C., Gebhart G.F. (1995) Intrathecal amitriptyline acts as an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the presence of inflammatory hyperalgesia in rats. *Anesthesiology* 83:1046-1054
- Eliav E., Herzberg U., Ruda M.A., Bennett G.J. (1999) Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain* 83:169-182
- Elmes S.J., Jhaveri M.D., Smart D., Kendall D.A., Chapman V. (2004) Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in naive rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 20:2311-2320
- Elmes S.J., Winyard L.A., Medhurst S.J., Clayton N.M., Wilson A.W., Kendall D.A., Chapman V. (2005) Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain* 118:327-335
- Engle M.P., Gassman M., Sykes K.T., Bettler B., Hammond D.L. (2006) Spinal nerve ligation does not alter the expression or function of GABA(B) receptors in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience* 138:1277-1287
- Erichsen H.K., Blackburn-Munro G. (2002) Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain* 98:151-161
- Erichsen H.K., Hao J.X., Xu X.J., Blackburn-Munro G. (2005) Comparative actions of the opioid analgesics morphine, methadone and codeine in rat models of peripheral and central neuropathic pain. *Pain* 116:347-358
- Esser M.J., Chase T., Allen G.V., Sawynok J. (2001) Chronic administration of amitriptyline and caffeine in a rat model of neuropathic pain: multiple interactions. *Eur J Pharmacol* 430:211-218
- Esser M.J., Sawynok J. (1999) Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptom and route effects. *Pain* 80:643-653
- Farquhar-Smith W.P., Egertova M., Bradbury E.J., McMahon S.B., Rice A.S., Elphick M.R. (2000) Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 15:510-521
- Farquhar-Smith W.P., Rice A.S. (2001) Administration of endocannabinoids prevents a referred hyperalgesia associated with inflammation of the urinary bladder. *Anesthesiology* 94:507-513

- Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M., Mansouri J., Mackie K., Blond O., Lai Y., Ma A.L., Mitchell R.L. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48:443-450
- Fields H. (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565-575
- Flatters S.J., Bennett G.J. (2004) Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109:150-161
- Flor H., Elbert T., Muhlneckel W., Pantev C., Wienbruch C., Taub E. (1998) Cortical reorganization and phantom phenomena in congenital and traumatic upper-extremity amputees. *Exp Brain Res* 119:205-212
- Fox A., Gentry C., Patel S., Kesingland A., Bevan S. (2003) Comparative activity of the anti-convulsants oxcarbazepine, carbamazepine, lamotrigine and gabapentin in a model of neuropathic pain in the rat and guinea-pig. *Pain* 105:355-362
- Fox A., Kesingland A., Gentry C., McNair K., Patel S., Urban L., James I. (2001) The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92:91-100
- Fride E., Foox A., Rosenberg E., Faigenboim M., Cohen V., Barda L., Blau H., Mechoulam R. (2003) Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol* 461:27-34
- Fu W.M., Chang T.K., Sun W.Z., Ling Q.D., Peng H.C., Liou H.C., Lu D.Y., Huang T.F. (2004) Inhibition of neuropathic pain by a potent disintegrin--triflavin. *Neurosci Lett* 368:263-268
- Fukuoka T., Tokunaga A., Tachibana T., Dai Y., Yamanaka H., Noguchi K. (2002) VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain* 99:111-120
- Galiègue S., Mary S., Marchand J., Dussossoy D., Carriere D., Carayon P., Bouaboula M., Shire D., Le Fur G., Casellas P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232:54-61
- Gaoni Y., Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 83:1646
- George A., Buehl A., Sommer C. (2004) Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. *Neurosci Lett* 372:215-219

- Gifford A.N., Ashby C.R., Jr. (1996) Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1431-1436
- Glass M., Felder C.C. (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17:5327-5333
- Gong J.P., Onaivi E.S., Ishiguro H., Liu Q.R., Tagliaferro P.A., Brusco A., Uhl G.R. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071:10-23
- Grelik C., Bennett G.J., Ribeiro-da-Silva A. (2005) Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *Eur J Neurosci* 21:2475-2487
- Guindon J., Beaulieu P. (2006) Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50:814-823
- Guindon J., De Lean A., Beaulieu P. (2006) Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* 121:85-93
- Guo J., Ikeda S.R. (2004) Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 65:665-674
- Gustafsson H., Flood K., Berge O.G., Brodin E., Olgart L., Stiller C.O. (2003) Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. *Exp Neurol* 182:427-434
- Gutierrez T., Nackley A.G., Neely M.H., Freeman K.G., Edwards G.L., Hohmann A.G. (2003) Effects of neurotoxic destruction of descending noradrenergic pathways on cannabinoid antinociception in models of acute and tonic nociception. *Brain Res* 987:176-185
- Hama A.T., Borsook D. (2005) Behavioral and pharmacological characterization of a distal peripheral nerve injury in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 81:170-181

- Hama A.T., Urban M.O. (2004) Antihyperalgesic effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 is mediated through an interaction with spinal metabotropic glutamate-5 receptors in rats. *Neurosci Lett* 358:21-24
- Hamplova-Peichlova J., Krusek J., Paclt I., Slavicek J., Lisa V., Vyskocil F. (2002) Citalopram inhibits L-type calcium channel current in rat cardiomyocytes in culture. *Physiol Res* 51:317-321
- Hampson R.E., Evans G.J., Mu J., Zhuang S.Y., King V.C., Childers S.R., Deadwyler S.A. (1995) Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* 56:2081-2088
- Hanus L., Abu-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D.E., Kustanovich I., Mechoulam R. (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3662-3665
- Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., Joris J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88
- Héon H. (2005) Les modèles animaux de douleur. In: *Pharmacologie de la douleur* (Beaulieu P, ed), Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal, pp 283-322
- Herrera B., Carracedo A., Diez-Zaera M., Guzman M., Velasco G. (2005) p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett* 579:5084-5088
- Herrero J.F., Laird J.M., Lopez-Garcia J.A. (2000) Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 61:169-203
- Herzberg U., Eliav E., Bennett G.J., Kopin I.J. (1997) The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 221:157-160
- Hofbauer R.K., Olausson H.W., Bushnell M.C. (2006) Thermal and tactile sensory deficits and allodynia in a nerve-injured patient: a multimodal psychophysical and functional magnetic resonance imaging study. *Clin J Pain* 22:104-108
- Hofmann H.A., De Vry J., Siegling A., Spreyer P., Denzer D. (2003) Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 470:17-25
- Hohmann A.G., Briley E.M., Herkenham M. (1999, a) Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res* 822:17-25

- Hohmann A.G., Tsou K., Walker J.M. (1999, b) Intrathecal cannabinoid administration suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord: comparison with morphine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20:1132-1136
- Hohmann A.G., Herkenham M. (1999, a) Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* 92:1171-1175
- Hohmann A.G., Herkenham M. (1999, b) Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90:923-931
- Hohmann A.G., Farthing J.N., Zvonok A.M., Makriyannis A. (2004) Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. *J Pharmacol Exp Ther* 308:446-453
- Hohmann A.G., Suplita R.L., Bolton N.M., Neely M.H., Fegley D., Mangieri R., Krey J.F., Walker J.M., Holmes P.V., Crystal J.D., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G., Piomelli D. (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435:1108-1112
- Hökfelt T.G.M., Zhang X., Xu X., Wiesenfeld-Halin Z. (2006) Central consequences of peripheral nerve damage. In: *Wall and Melzack's Textbook of Pain* (Mc Mahon SB, Koltzenburg M, eds), London: Churchill Livingstone, pp 947-949
- Honore P., Wismer C.T., Mikusa J., Zhu C.Z., Zhong C., Gauvin D.M., Gomtsyan A., El Kouhen R., Lee C.H., Marsh K., Sullivan J.P., Faltynek C.R., Jarvis M.F. (2005) A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 314:410-421
- Hudson L.J., Bevan S., Wotherspoon G., Gentry C., Fox A., Winter J. (2001) VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* 13:2105-2114
- Hwang J.H., Yaksh T.L. (1997) The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 70:15-22
- Ibrahim M.M., Deng H., Zvonok A., Cockayne D.A., Kwan J., Mata H.P., Vanderah T.W., Lai J., Porreca F., Makriyannis A., Malan T.P., Jr. (2003) Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10529-10533

- Idanpaan-Heikkila J.J., Guilbaud G. (1999) Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain* 79:281-290
- Janig W., Baron R. (2003) Complex regional pain syndrome: mystery explained? *Lancet Neurol* 2:687-697
- Jarvis M.F. (2003) Contributions of P2X3 homomeric and heteromeric channels to acute and chronic pain. *Expert Opin Ther Targets* 7:513-522
- Jasmin L., Kohan L., Franssen M., Janni G., Goff J.R. (1998) The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 75:367-382
- Jensen T.S., Gottrup H., Sindrup S.H., Bach F.W. (2001) The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:1-11
- Jorum E., Warncke T., Stubhaug A. (2003) Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine, a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo. *Pain* 101:229-235
- Julius D., Basbaum A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210
- Kage K., Niforatos W., Zhu C.Z., Lynch K.J., Honore P., Jarvis M.F. (2002) Alteration of dorsal root ganglion P2X3 receptor expression and function following spinal nerve ligation in the rat. *Exp Brain Res* 147:511-519
- Kalso E. (2005) Sodium channel blockers in neuropathic pain. *Curr Pharm Des* 11:3005-3011
- Kaminski N.E. (1998) Inhibition of the cAMP signaling cascade via cannabinoid receptors: a putative mechanism of immune modulation by cannabinoid compounds. *Toxicol Lett* 102-103:59-63
- Karl A., Birbaumer N., Lutzenberger W., Cohen L.G., Flor H. (2001) Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *J Neurosci* 21:3609-3618
- Kathmann M., Bauer U., Schlicker E., Gothert M. (1999) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359:466-470



- Katona I., Sperlagh B., Sik A., Kafalvi A., Vizi E.S., Mackie K., Freund T.F. (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558
- Kim C.H., Oh Y., Chung J.M., Chung K. (2001, a) The changes in expression of three subtypes of TTX sensitive sodium channels in sensory neurons after spinal nerve ligation. *Brain Res Mol Brain Res* 95:153-161
- Kim H.I., Kim T.H., Shin Y.K., Lee C.S., Park M., Song J.H. (2005) Anandamide suppression of Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1062:39-47
- Kim H.J., Na H.S., Back S.K., Hong S.K. (2001, b) Sympathetic sprouting in sensory ganglia depends on the number of injured neurons. *Neuroreport* 12:3529-3532
- Kim H.J., Na H.S., Sung B., Nam H.J., Chung Y.J., Hong S.K. (1999) Is sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia responsible for the production of neuropathic pain in a rat model? *Neurosci Lett* 269:103-106
- Kim K.J., Yoon Y.W., Chung J.M. (1997) Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113:200-206
- Kim S.H., Chung J.M. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363
- Kim S.H., Won S.J., Mao X.O., Jin K., Greenberg D.A. (2006) Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 69:691-696
- Kingery W.S., Castellote J.M., Maze M. (1999) Methylprednisolone prevents the development of autotomy and neuropathic edema in rats, but has no effect on nociceptive thresholds. *Pain* 80:555-566
- Kingery W.S., Castellote J.M., Wang E.E. (1993) A loose ligature-induced mononeuropathy produces hyperalgesias mediated by both the injured sciatic nerve and the adjacent saphenous nerve. *Pain* 55:297-304
- Kingery W.S., Vallin J.A. (1989) The development of chronic mechanical hyperalgesia, autotomy and collateral sprouting following sciatic nerve section in rat. *Pain* 38:321-332
- Koeppen A.H. (2004) Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 220:115-117

- Koerber H.R., Mirnics K., Brown P.B., Mendell L.M. (1994) Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. *J Neurosci* 14:3655-3671
- Kofalvi A., Rodrigues R.J., Ledent C., Mackie K., Vizi E.S., Cunha R.A., Sperlagh B. (2005) Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 25:2874-2884
- Kohama I., Ishikawa K., Kocsis J.D. (2000) Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. *J Neurosci* 20:1538-1549
- Kohno T., Ji R.R., Ito N., Allchorne A.J., Befort K., Karchewski L.A., Woolf C.J. (2005) Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 117:77-87
- Kupers R., Yu W., Persson J.K., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z. (1998) Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. *Pain* 76:45-59
- LaBuda C.J., Little P.J. (2005) Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J Neurosci Methods* 144:175-181
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. (2001, a) [Acute pain measurement in animals. Part 1]. *Ann Fr Anesth Reanim* 20:347-365
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S.W. (2001, b) [Critical analysis of animal models of acute pain. II.]. *Ann Fr Anesth Reanim* 20:452-470
- Lee B.H., Seong J., Kim U.J., Won R., Kim J. (2005) Behavioral characteristics of a mouse model of cancer pain. *Yonsei Med J* 46:252-259
- Lekan H.A., Carlton S.M., Coggeshall R.E. (1996) Sprouting of A beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 208:147-150
- Levy D., Zochodne D.W. (2000) Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 86:265-271
- Liao C., Zheng J., David L.S., Nicholson R.A. (2004) Inhibition of voltage-sensitive sodium channels by the cannabinoid 1 receptor antagonist AM 251 in mammalian brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94:73-78

- Lim G., Sung B., Ji R.R., Mao J. (2003) Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats *Pain* 105:275-283
- Lowe E.G., Allmendinger P.D., Lowe R. (2005) Cold sensitivity as a new side effect after sympathectomy for hyperhidrosis. *Ann Thorac Surg* 80:2356-2358
- Lutz B. (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:123-142
- Ma F., Xie H., Dong Z.Q., Wang Y.Q., Wu G.C. (2005) Expression of ORL1 mRNA in some brain nuclei in neuropathic pain rats. *Brain Res* 1043:214-217
- Malan T.P., Jr., Ibrahim M.M., Deng H., Liu Q., Mata H.P., Vanderah T., Porreca F., Makriyannis A. (2001) CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93:239-245
- Malan T.P., Jr., Ibrahim M.M., Lai J., Vanderah T.W., Makriyannis A., Porreca F. (2003) CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol* 3:62-67
- Marchand F., Perretti M., McMahon S.B. (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-532
- Marchand S. (2005) Neurophysiologie de la douleur. In: *Pharmacologie de la douleur* (Beaulieu P, ed), Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal, pp 3-37
- Maresz K., Carrier E.J., Ponomarev E.D., Hillard C.J., Dittel B.N. (2005) Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95:437-445
- Martin T.J., Hairston C.T., Lutz P.O., Harris L.S., Porreca F. (1998) Anti-allodynic actions of intravenous opioids in the nerve injured rat: potential utility of heroin and dihydroetorphine against neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 357:25-32
- Martin W.J., Lai N.K., Patrick S.L., Tsou K., Walker J.M. (1993) Antinociceptive actions of cannabinoids following intraventricular administration in rats. *Brain Res* 629:300-304
- Martinez-Caro L., Laird J.M. (2000) Allodynia and hyperalgesia evoked by sciatic mononeuropathy in NK1 receptor knockout mice. *Neuroreport* 11:1213-1217

- Martinez V., Christensen D., Kayser V. (2002) The glycine/NMDA receptor antagonist (+)-HA966 enhances the peripheral effect of morphine in neuropathic rats. *Pain* 99:537-545
- Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564
- McAllister S.D., Glass M. (2002) CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:161-171
- McAllister S.D., Griffin G., Satin L.S., Abood M.E. (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 291:618-626
- McCarson K.E., Ralya A., Reisman S.A., Enna S.J. (2005) Amitriptyline prevents thermal hyperalgesia and modifications in rat spinal cord GABA(B) receptor expression and function in an animal model of neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 71:196-202
- McGaraughty S., Wismer C.T., Zhu C.Z., Mikusa J., Honore P., Chu K.L., Lee C.H., Faltynek C.R., Jarvis M.F. (2003) Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol* 140:1381-1388
- McKemy D.D. (2005) How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 1:16
- McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58
- McLachlan E.M., Hu P. (1998) Axonal sprouts containing calcitonin gene-related peptide and substance P form pericellular baskets around large diameter neurons after sciatic nerve transection in the rat. *Neuroscience* 84:961-965
- McLachlan E.M., Janig W., Devor M., Michaelis M. (1993) Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363:543-546
- Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R., et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90

- Mechoulam R., Hanus L. (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids* 108:1-13
- Meller S.T., Dykstra C., Grzybycki D., Murphy S., Gebhart G.F. (1994) The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33:1471-1478
- Mendiguren A., Pineda J. (2004) Cannabinoids enhance N-methyl-D-aspartate-induced excitation of locus coeruleus neurons by CB1 receptors in rat brain slices. *Neurosci Lett* 363:1-5
- Mert T., Daglioglu Y.K., Gunay I., Gocmen C. (2004) Changes in electrophysiological properties of regenerating rat peripheral nerves after crush injury. *Neurosci Lett* 363:212-217
- Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monsarrat B., et al. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532-535
- Meyer R.A., Ringkamp M., Campbell J.N., Raja S.N. (2006) Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: *Wall and Melzack's Textbook of Pain* (Mc Mahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 3-34
- Michaelis M., Devor M., Janig W. (1996) Sympathetic modulation of activity in rat dorsal root ganglion neurons changes over time following peripheral nerve injury. *J Neurophysiol* 76:753-763
- Mika J., Schafer M.K., Obara I., Weihe E., Przewlocka B. (2004) Morphine and endomorphin-1 differently influence pronociceptin/orphanin FQ system in neuropathic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78:171-178
- Miletic G., Draganic P., Pankratz M.T., Miletic V. (2003) Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1. *Pain* 105:347-353
- Milligan E.D., Twining C., Chacur M., Biedenkapp J., O'Connor K., Poole S., Tracey K., Martin D., Maier S.F., Watkins L.R. (2003) Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23:1026-1040
- Miyabe T., Miletic G., Miletic V. (2006) Loose ligation of the sciatic nerve in rats elicits transient up-regulation of Homer1a gene expression in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 398:296-299

- Moalem G., Grafe P., Tracey D.J. (2005) Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. *Neuroscience* 134:1399-1411
- Mogil J.S., Crager S.E. (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112:12-15
- Moldrich G., Wenger T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21:1735-1742
- Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., Meunier J.C. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341:33-38
- Morisset V., Urban L. (2001) Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 86:40-48
- Mosconi T., Kruger L. (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57
- Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65
- Na H.S., Han J.S., Ko K.H., Hong S.K. (1994) A behavioral model for peripheral neuropathy produced in rat's tail by inferior caudal trunk injury. *Neurosci Lett* 177:50-52
- Nackley A.G., Suplita R.L., 2nd, Hohmann A.G. (2003) A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 117:659-670
- Narita M., Kuzumaki N., Suzuki M., Narita M., Oe K., Yamazaki M., Yajima Y., Suzuki T. (2004) Increased phosphorylated-mu-opioid receptor immunoreactivity in the mouse spinal cord following sciatic nerve ligation. *Neurosci Lett* 354:148-152
- Nikolajsen L., Hansen C.L., Nielsen J., Keller J., Arendt-Nielsen L., Jensen T.S. (1996) The effect of ketamine on phantom pain: a central neuropathic disorder maintained by peripheral input. *Pain* 67:69-77
- O'Sullivan S.E., Kendall D.A., Randall M.D. (2005) The effects of Delta9-tetrahydrocannabinol in rat mesenteric vasculature, and its interactions with the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol* 145:514-526

- Obara I., Przewlocki R., Przewlocka B. (2005) Spinal and local peripheral antiallodynic activity of Ro64-6198 in neuropathic pain in the rat. *Pain* 116:17-25
- Obata K., Katsura H., Mizushima T., Yamanaka H., Kobayashi K., Dai Y., Fukuoka T., Tokunaga A., Tominaga M., Noguchi K. (2005) TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115:2393-2401
- Obata K., Yamanaka H., Dai Y., Mizushima T., Fukuoka T., Tokunaga A., Yoshikawa H., Noguchi K. (2004) Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp Neurol* 188:149-160
- Obata K., Yamanaka H., Kobayashi K., Dai Y., Mizushima T., Katsura H., Fukuoka T., Tokunaga A., Noguchi K. (2006) The effect of site and type of nerve injury on the expression of brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion and on neuropathic pain behavior. *Neuroscience* 137:961-970
- Ohsawa M., Mizoguchi H., Narita M., Kamei J., Nagase H., Tseng L.F. (2000) Effects of a mu-opioid receptor agonist on G-protein activation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 401:55-58
- Pascual D., Goicoechea C., Suardiaz M., Martin M.I. (2005) A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats. *Pain* 118:23-34
- Pedersen L.H., Blackburn-Munro G. (2006) Pharmacological characterisation of place escape/avoidance behaviour in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Psychopharmacology (Berl)* 185:208-217
- Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705-715
- Pelissier T., Laurido C., Kramer V., Hernandez A., Paeile C. (2003) Antinociceptive interactions of ketamine with morphine or methadone in mononeuropathic rats. *Eur J Pharmacol* 477:23-28
- Perras C. (2005) Sativex for the management of multiple sclerosis symptoms. *Issues Emerg Health Technol*:1-4
- Pertwee R.G. (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63:569-611

- Pertwee R.G. (2005) The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 7:E625-654
- Petersen M., Eckert A.S., Segond von Banchet G., Heppelmann B., Klusch A., Kniffki K.D. (1998) Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* 83:949-959
- Pettit D.A., Harrison M.P., Olson J.M., Spencer R.F., Cabral G.A. (1998) Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51:391-402
- Pineyro G., Azzi M. (2005) Pharmacologie des antidépresseurs et des anticonvulsivants. In: *Pharmacologie de la douleur* (Beaulieu P, ed), Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal, pp 213-234
- Pol O., Murtra P., Caracul L., Valverde O., Puig M.M., Maldonado R. (2006) Expression of opioid receptors and c-fos in CB1 knockout mice exposed to neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50:123-132
- Polomano R.C., Bennett G.J. (2001) Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. *Pain Med* 2:8-14
- Polomano R.C., Mannes A.J., Clark U.S., Bennett G.J. (2001) A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 94:293-304
- Qian J., Brown S.D., Carlton S.M. (1996) Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in a rat model of peripheral neuropathy. *Brain Res* 715:51-62
- Quartilho A., Mata H.P., Ibrahim M.M., Vanderah T.W., Porreca F., Makriyannis A., Malan T.P., Jr. (2003) Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99:955-960
- Raghavendra V., Tanga F., DeLeo J.A. (2003) Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306:624-630
- Raja S.N., Haythornthwaite J.A., Pappagallo M., Clark M.R., Travison T.G., Sabeen S., Royall R.M., Max M.B. (2002) Opioids versus antidepressants in postherpetic neuralgia: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology* 59:1015-1021



- Rang H.P., Ritter J.M., Moore P.K. (2003, a) Amino acid transmitters. In: *Pharmacology* (Rang HP DM, Ritter JM, Moore PK., ed), Edimburgh: Churchill Livingstone, pp 462-473
- Rang H.P., Ritter J.M., Moore P.K. (2003, b) Analgesic drugs. In: *Pharmacology* (Rang HP DM, Ritter JM, Moore PK., ed), Edimburgh: Churchill Livingstone, pp 562-584
- Rang H.P., Ritter JM, Moore PK. (2003, c) Antiepileptic drugs. In: *Pharmacology* (Rang HP DM, Ritter JM, Moore PK., ed), Edimburgh: Churchill Livingstone, pp 550-561
- Rashid M.H., Inoue M., Bakoshi S., Ueda H. (2003, a) Increased expression of vanilloid receptor 1 on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effect of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 306:709-717
- Rashid M.H., Inoue M., Kondo S., Kawashima T., Bakoshi S., Ueda H. (2003, b) Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304:940-948
- Rashid M.H., Inoue M., Toda K., Ueda H. (2004) Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309:380-387
- Rashid M.H., Ueda H. (2005) Pre-injury administration of morphine prevents development of neuropathic hyperalgesia through activation of descending monoaminergic mechanisms in the spinal cord in mice. *Mol Pain* 1:1-9
- Reeh P.W. (1986) Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 66:141-146
- Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F.J., Jr., Civelli O. (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270:792-794
- Ro L.S., Chen S.T., Tang L.M., Jacobs J.M. (1999) Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain* 79:265-274
- Robinson L., Meert T.F. (2005) Stability of neuropathic pain symptoms in partial sciatic nerve ligation in rats is affected by suture material. *Neurosci Lett* 373:125-129

- Rode F., Jensen D.G., Blackburn-Munro G., Bjerrum O.J. (2005) Centrally-mediated antinociceptive actions of GABA(A) receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 516:131-138
- Ross R.A., Coutts A.A., McFarlane S.M., Anavi-Goffer S., Irving A.J., Pertwee R.G., MacEwan D.J., Scott R.H. (2001) Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40:221-232
- Rowbotham M.C., Twilling L., Davies P.S., Reisner L., Taylor K., Mohr D. (2003) Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. *N Engl J Med* 348:1223-1232
- Roza C., Laird J.M., Souslova V., Wood J.N., Cervero F. (2003) The tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. *J Physiol* 550:921-926
- Rueda D., Galve-Roperh I., Haro A., Guzman M. (2000) The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58:814-820
- Ruocco I., Cuello A.C., Ribeiro-Da-Silva A. (2000) Peripheral nerve injury leads to the establishment of a novel pattern of sympathetic fibre innervation in the rat skin. *J Comp Neurol* 422:287-296
- Sade H., Muraki K., Ohya S., Hatano N., Imaizumi Y. (2006) Activation of large-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by cannabinoids. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C77-86
- Sagar D.R., Kelly S., Millns P.J., O'Shaughnessey C.T., Kendall D.A., Chapman V. (2005) Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 22:371-379
- Salio C., Doly S., Fischer J., Franzoni M.F., Conrath M. (2002, a) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 329:13-16
- Salio C., Fischer J., Franzoni M.F., Conrath M. (2002, b) Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 110:755-764
- Samson M.T., Small-Howard A., Shimoda L.M., Koblan-Huberson M., Stokes A.J., Turner H. (2003) Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. *J Immunol* 170:4953-4962

- Sant G.R., LaRock D.R. (1994) Standard intravesical therapies for interstitial cystitis. *Urol Clin North Am* 21:73-83
- Sanudo-Pena M.C., Strangman N.M., Mackie K., Walker J.M., Tsou K. (1999) CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20:1115-1120
- Sawynok J. (2003) Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev* 55:1-20
- Schatz A.R., Lee M., Condie R.B., Pulaski J.T., Kaminski N.E. (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:278-287
- Schlicker E., Timm J., Gothert M. (1996) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354:791-795
- Seltzer Z., Devor M. (1979) Ephaptic transmission in chronically damaged peripheral nerves. *Neurology* 29:1061-1064
- Seltzer Z., Dubner R., Shir Y. (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218
- Shen M., Piser T.M., Seybold V.S., Thayer S.A. (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16:4322-4334
- Shim B., Kim D.W., Kim B.H., Nam T.S., Leem J.W., Chung J.M. (2005) Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors in rats with experimental peripheral neuropathy. *Neuroscience* 132:193-201
- Shoemaker J.L., Joseph B.K., Ruckle M.B., Mayeux P.R., Prather P.L. (2005) The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 314:868-875
- Siegling A., Hofmann H.A., Denzer D., Mauler F., De Vry J. (2001) Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 415:R5-7
- Smith M.P., Beacham D., Ensor E., Koltzenburg M. (2004, a) Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. *Neuroreport* 15:1399-1403

- Smith S.B., Crager S.E., Mogil J.S. (2004, b) Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. *Life Sci* 74:2593-2604
- Sommer C., Schmidt C., George A., Toyka K.V. (1997) A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett* 237:45-48
- Stander S., Schmelz M., Metze D., Luger T., Rukwied R. (2005) Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci* 38:177-188
- Stiller C.O., Cui J.G., O'Connor W.T., Brodin E., Meyerson B.A., Linderorth B. (1996) Release of gamma-aminobutyric acid in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery* 39:367-374; discussion 374-365
- Stone L.S., Vulchanova L., Riedl M.S., Williams F.G., Wilcox G.L., Elde R. (2004) Effects of peripheral nerve injury on delta opioid receptor (DOR) immunoreactivity in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 361:208-211
- Stumpff F., Boxberger M., Krauss A., Rosenthal R., Meissner S., Choritz L., Wiederholt M., Thieme H. (2005) Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 80:697-708
- Sugiura T., Kobayashi Y., Oka S., Waku K. (2002) Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:173-192
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97
- Sung B., Loh H.H., Wei L. (2000) Association of kappa opioid receptor mRNA upregulation in dorsal root ganglia with mechanical allodynia in mice following nerve injury. *Neurosci Lett* 291:163-166
- Suzuki R., Matthews E.A., Dickenson A.H. (2001) Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 91:101-109

- Szabo B., Muller T., Koch H. (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* 73:1084-1089
- Takasaki I., Andoh T., Nitta M., Takahata H., Nemoto H., Shiraki K., Nojima H., Kuraishi Y. (2000) Pharmacological and immunohistochemical characterization of a mouse model of acute herpetic pain. *Jpn J Pharmacol* 83:319-326
- Tal M., Bennett G.J. (1994) Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57:375-382
- Tal M., Wall P.D., Devor M. (1999) Myelinated afferent fiber types that become spontaneously active and mechanosensitive following nerve transection in the rat. *Brain Res* 824:218-223
- Tamai H., Sawamura S., Takeda K., Orii R., Hanaoka K. (2005) Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of nociceptin receptor antagonist, JTC-801, in rats after spinal nerve injury and inflammation. *Eur J Pharmacol* 510:223-228
- Tanabe M., Takasu K., Kasuya N., Shimizu S., Honda M., Ono H. (2005) Role of descending noradrenergic system and spinal alpha2-adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. *Br J Pharmacol* 144:703-714
- Tanner K.D., Reichling D.B., Levine J.D. (1998) Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Neurosci* 18:6480-6491
- Tominaga M., Caterina M.J. (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61:3-12
- Truong W., Cheng C., Xu Q.G., Li X.Q., Zochodne D.W. (2003) Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol* 53:366-375
- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411
- Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka S., Salter M.W., Inoue K. (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783
- Turkanis S.A., Partlow L.M., Karler R. (1991) Delta-9-tetrahydrocannabinol depresses inward sodium current in mouse neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* 30:73-77

- Tzabazis A., Kim P.H., Sweitzer S.M., Yeomans D.C. (2004) Ameroid rings for gradual chronic constriction of the sciatic nerve in rats: contribution of different nerves to neuropathic pain. *Brain Res Bull* 64:127-132
- Urban M.O., Ren K., Park K.T., Campbell B., Anker N., Stearns B., Aiyar J., Belley M., Cohen C., Bristow L. (2005) Comparison of the antinociceptive profiles of gabapentin and 3-methylgabapentin in rat models of acute and persistent pain: implications for mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1209-1216
- Valenzano K.J., Tafesse L., Lee G., Harrison J.E., Boulet J.M., Gottshall S.L., Mark L., Pearson M.S., Miller W., Shan S., Rabadi L., Rotshteyn Y., Chaffer S.M., Turchin P.I., Elsemore D.A., Toth M., Koetzner L., Whiteside G.T. (2005) Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology* 48:658-672
- Van Sickle M.D., Duncan M., Kingsley P.J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J.S., Marnett L.J., Di Marzo V., Pittman Q.J., Patel K.D., Sharkey K.A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332
- Venance L., Maldonado R., Manzoni O. (2004) [Endocannabinoids in the central nervous system]. *Med Sci (Paris)* 20:45-53
- Vissers K.C., Hoffmann V.L., Adriaensen H.F., Heylen R.J., Meert T.F. (2005) Increased cold allodynia following intrathecal N-methyl-D-aspartate in rats with a mononeuropathy. *Life Sci* 77:414-422
- Waksman Y., Olson J.M., Carlisle S.J., Cabral G.A. (1999) The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1357-1366
- Walker K.M., Urban L., Medhurst S.J., Patel S., Panesar M., Fox A.J., McIntyre P. (2003) The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304:56-62
- Wall P.D., Devor M. (1983) Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17:321-339
- Wall P.D., Devor M., Inbal R., Scadding J.W., Schonfeld D., Seltzer Z., Tomkiewicz M.M. (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-111

- Wall P.D., Gutnick M. (1974) Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol* 43:580-593
- Wallace M.S., Rowbotham M.C., Katz N.P., Dworkin R.H., Dotson R.M., Galer B.S., Rauck R.L., Backonja M.M., Quessy S.N., Meisner P.D. (2002) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a glycine antagonist in neuropathic pain. *Neurology* 59:1694-1700
- Wallace V.C., Cottrell D.F., Brophy P.J., Fleetwood-Walker S.M. (2003) Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids. *J Neurosci* 23:3221-3233
- Walter L., Franklin A., Witting A., Wade C., Xie Y., Kunos G., Mackie K., Stella N. (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23:1398-1405
- Wang Y.X., Bowersox S.S., Pettus M., Gao D. (1999) Antinociceptive properties of fenfluramine, a serotonin reuptake inhibitor, in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1008-1016
- Wang Z., Gardell L.R., Ossipov M.H., Vanderah T.W., Brennan M.B., Hochgeschwender U., Hruby V.J., Malan T.P., Jr., Lai J., Porreca F. (2001) Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 21:1779-1786
- Wasner G., Schattschneider J., Heckmann K., Maier C., Baron R. (2001) Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): mechanisms and diagnostic value. *Brain* 124:587-599
- Waxman S.G., Kocsis J.D., Black J.A. (1994) Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72:466-470
- Wegert S., Ossipov M.H., Nichols M.L., Bian D., Vanderah T.W., Malan T.P., Jr., Porreca F. (1997) Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain* 71:57-64
- Whiteside G.T., Gottshall S.L., Boulet J.M., Chaffer S.M., Harrison J.E., Pearson M.S., Turchin P.I., Mark L., Garrison A.E., Valenzano K.J. (2005) A role for cannabinoid receptors, but not endogenous opioids, in the antinociceptive activity of the CB2-selective agonist, GW405833. *Eur J Pharmacol* 528:65-72

- Winqvist R.J., Pan J.Q., Gribkoff V.K. (2005) Use-dependent blockade of Cav2.2 voltage-gated calcium channels for neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 70:489-499
- Wolf G., Gabay E., Tal M., Yirmiya R., Shavit Y. (2006) Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain* 120:315-324
- Woolf C.J., Shortland P., Coggeshall R.E. (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78
- Wotherspoon G., Fox A., McIntyre P., Colley S., Bevan S., Winter J. (2005) Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* 135:235-245
- Yaksh T.L. (1989) Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37:111-123
- Yaksh T.L. (2006) Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain* 7 Suppl 1:S13-30
- Yang L., Zhang F.X., Huang F., Lu Y.J., Li G.D., Bao L., Xiao H.S., Zhang X. (2004) Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *Eur J Neurosci* 19:871-883
- Yasuda T., Miki S., Yoshinaga N., Senba E. (2005) Effects of amitriptyline and gabapentin on bilateral hyperalgesia observed in an animal model of unilateral axotomy. *Pain* 115:161-170
- Yesilyurt O., Dogrul A., Gul H., Seyrek M., Kusmez O., Ozkan Y., Yildiz O. (2003) Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain* 105:303-308
- Yoshihara S., Morimoto H., Ohori M., Yamada Y., Abe T., Arisaka O. (2005) Endogenous cannabinoid receptor agonists inhibit neurogenic inflammations in guinea pig airways. *Int Arch Allergy Immunol* 138:80-87
- Zhang J., Hoffert C., Vu H.K., Groblewski T., Ahmad S., O'Donnell D. (2003) Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 17:2750-2754
- Zhang X., Bao L., Shi T.J., Ju G., Elde R., Hokfelt T. (1998) Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 82:223-240



Zhou J., Chung K., Chung J.M. (2001) Development of purinergic sensitivity in sensory neurons after peripheral nerve injury in the rat. *Brain Res* 915:161-169

Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H., Sorgard M., Di Marzo V., Julius D., Hogestatt E.D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457



Liste des coauteurs des articles inclus dans la thèse intitulée:

Implication du système cannabinoïde dans un nouveau modèle de douleur neuropathique périphérique.

Vincent Pichette<sup>1,2</sup>,

François Leblond<sup>2</sup>,

Karine Desbiens<sup>2</sup>

Pierre Beaulieu<sup>1,3</sup>

Département de Pharmacologie<sup>1</sup> - Université de Montréal,

Département de Néphrologie, Centre de Recherche Guy Bernier Research<sup>2</sup> - Hôpital  
Maisonneuve-Rosemont,

Département d'Anesthésiologie<sup>3</sup> - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
(CHUM)

## Déclaration des coauteurs d'un article

### Identification de l'étudiant et du programme

Jean-Sébastien Walczak

Programme : PhD en Pharmacologie, 3-520-1-0

### Description de l'article

#### Liste des auteurs :

Jean-Sébastien Walczak

Vincent Pichette

François A Leblond

Karine Desbiens

Pierre Beaulieu

#### Titre de l'article :

Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain.

#### Revue :

Neuroscience

#### Année :

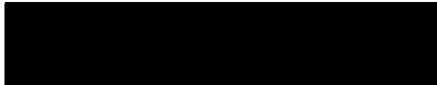



2005

### Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Sébastien

Walczak inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Implication du système

cannabinoïde dans un nouveau modèle de douleur neuropathique périphérique

Dr Vincent Pichette		3/04/06
	Signature	Date
Dr François A Leblond		3/04/06
	Signature	Date
Karine Desbiens		31/03/2006
	Signature	Date
Dr Pierre Beaulieu		31/03/2006
	Signature	Date

## Déclaration des coauteurs d'un article

### Identification de l'étudiant et du programme

Jean-Sébastien Walczak

Programme : PhD en Pharmacologie, 3-520-1-0

### Description de l'article

#### Liste des auteurs :

Jean-Sébastien Walczak

Vincent Pichette

François A Leblond

Karine Desbiens

Pierre Beaulieu

#### Titre de l'article :

Characterization of the chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes.

#### Revue :

Journal of Neuroscience Research

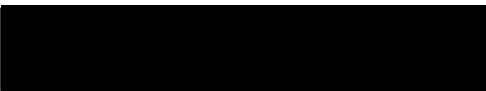



#### Année :

2006

### Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Jean-Sébastien

Walczak inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Implication du système cannabinoïde dans un nouveau modèle de douleur neuropathique périphérique

✓		3/04/06
Dr Vincent Pichette	Signature	Date
		3/04/06
Dr François A Leblond	Signature	Date
		31/03/2006
Karine Desbiens	Signature	Date
		31/03/2006
Dr Pierre Beaulieu	Signature	Date

## **Déclaration des coauteurs d'un article**

### **Identification de l'étudiant et du programme**

Jean-Sébastien Walczak

Programme : PhD en Pharmacologie, 3-520-1-0

### **Description de l'article**

#### **Liste des auteurs :**

Jean-Sébastien Walczak

Pierre Beaulieu

#### **Titre de l'article :**

Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique.

#### **Revue :**

Neuroscience Letters

#### **Année :**

2006

### **Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Jean-Sébastien Walczak** inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : **Implication du système cannabinoïde dans un nouveau modèle de douleur neuropathique périphérique**

  
Dr Pierre Beaulieu

Signature

30/03/06  
Date